

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1957

THÈSE

N° 139

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME d'ÉTAT)

PAR

François, Victor, Auguste ARCHINET

Né le 18 Novembre 1928 à LYON (3^e)

Présentée et soutenue publiquement le

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE L'ACTION IN VITRO
DE LA STREPTOMYCINE
SUR "BACTERIDIUM ANTHRACIS"

Président : Monsieur FASQUELLE (Professeur)

DACTYLO-SORBONNE

8, Rue Casimir - Delavigne
PARIS - VI^e

1957

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

--:-

Année 1957

N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

François, Victor, Auguste ARCHINET

Né le 18 novembre 1928 à L Y O N (3ème)

--:-

Présentée et soutenue publiquement
le

--:-

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE L'ACTION IN VITRO DE LA STREPTOMYCINE
SUR "BACTERIDIUM ANTHRACIS"

--:-

Président : Monsieur FASQUELLE (Professeur)

--:-

DACTYLO-SORBONNE
8, rue Casimir Delavigne
PARIS
1957.

DOYEN HONORAIRE :

M. BAUDOUIN

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. BAUDOUIN, BENARD, CADENAT, CARNOT, CHABROL, CHAMPY, CHEVASSU, DELBET, DONZELOT, GASTINEL, GUILLAIN, HALPHEN, HARVIER, LAROCHE G., LAUBRY, LEMAITRE, LEMIERRE, LEVY-SOLAL, LHERMITTE, LIAN, LOEPER, MARION, MATHIEU, MOCQUOT, MONDOR, MULON, OLIVIER E., OMBREDANNE, SANNIE, SEZARY, TANON.

DOYEN Léon BINET
Membre de l'Institut
ASSESEUR Jean VERNE

I.- PROFESSEURS

MM

Anatomie	CORDIER	
Anatomie pathologique	DELARUE	
Bactériologie	FASQUELLE	
Biologie appliquée à l'Educa- tion physique et aux Sports)	CHAILLET-BERT	
Biologie Médicale	FAUVERT	
Cancérologie médicale, sociale	BERNARD J.	
Carcinologie	N.	
Chimie Médicale	JAYLE	
Cliniques Chirur. {	Hôtel-Dieu	BROCQ
	Broussais	G.d'ALLAINES
	Salpêtrière	MOULONGUET
	Cochin	QUENU
Clinique chirurgicale répara- trice et orthopédique }	{ MERLE d'AU- BIGNE	
Clinique de Cardiologie	MOUQUIN	
Clinique chirurgicale infan- tile et d'orthopédie }	{ FEVRE	
Clinique chir. pleuro-pulmon.	MONOD	
Clinique de la Tuberculose	BERNARD E.	
Clinique de neuro-chirurgie	{ PETIT- DUTAILLIS	
	LELONG	
Clinique de Puériculture	LELONG	
Clinique des maladies cutanées} et syphilitiques }	{ DEGOS	
Clinique des maladies du sang	CHEVALLIER	
Clinique des maladies du systè- me nerveux }	{ ALAJOUANINE	

Clinique des maladies des enf.	DEBRE
Clinique des maladies infect.	MOLLARET
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale	DELAY
Clinique du diabète sucré et des maladies de la nutrition	BOULIN
Clinique Gynécologique	F. BRENTANO BARIETY J. BESANÇON MOREAU de GENNES
Cliniques Médicales	
Clinique méd. hydro-climat. ther.	DEBRAY
Clinique médicale propédeutique	PASTEUR V.-R. LANTUEJOUL VARANGOT LACOMME
Cliniques obstétricales	
Clinique ophtalmologique	VELTER
Clinique oto-rhino-laryngologique	AUBIN
Clinique psychiatrique infantile	HEUYER
Clinique rhumatologique	COSTE
Clinique stomatologique	DECHAUME
Clinique urologique	FÉY
Embryologie	GIROUD
Génétique	LAMY
Histoire de la Méd. et de la Chir.	SOULIE
Histologie	VERNE
Hygiène et Clinique lère Enfance	CATHALA
Hygiène et Méd. Préventive	JOANNON
Médecine du Travail	DESOILLE
Médecine légale	PIEDELIEVRE
Parasitologie et hist. nat. méd.	GALLIARD
Pathologie chirurgicale	MENEGAUX
Pathologie exotique	LAVIER
Path. expérimentale et comparée	LENEGRE
Path. Hum. et Immun. exp.	MERKLEN
Pathologie médicale	DECOURT
Path. et Thérapeut. générales	GARCIN
Pédiatrie sociale	Julien MARIE
Pharmacologie et matière méd.	HAZARD
Physico-chimie méd. (ch. t. pers)	DOGNON
Physiologie	BINET
Physique médicale	STROHL
Problèmes alimentaires (c. t. pers)	RICHET
Radiologie médicale	DESGREZ
Technique chirurgicale	PATEL
Thérapeutique	TURPIN
Thérapeutique chirurgicale	SENEQUE
Thérapeutique médicale	LEMAIRE

LI.- PROFESSEURS SANS CHAIRE
MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES ET AGREGES

	MM.		MM.
Anatomie	(CABROL DEBEYRE DELMAS OLIVIER G. Melle GAU-- THIER V. BUSSER GOUYGOU CHRISTOL NEVOT BOURLIERE ETTORI POLONOVSKI J DUPERRAT TUCHMANN BULLIARD COUJARD N.... CORNET BOYER DEPARIS BASTIN DEROBERTE GAULTIER HADENGUE DAVID LHERMITTE GRASSET LE LORLIER LEPAGE MERGER MORIN RAVINA ROBEY BREGEAT DESVIGNES JUDET AUBRY MADURO BRUMPT CHABAUD ABOULKER BARCAT BAUMANN CAUCHOIX	Pat. Chir.	(DUBOST FAUREL FLABEAU GERMAIN GOSSET LAURENCE LORTAT-JACOB MATHEY OLIVIER(CI) POILLEUX THOMERET VERNE(J M) MAURICE LOEPER BOUVIER BOUDIN BRICALRE BRISSAUD CASTAIGNE CONTE DEROT DOMART LAMOTTE LAROCHÉ MACREZ MILLIEZ PEQUIGNOT PERRAULT RAMBERT ROYER THIEFFRY TURIAF WOLFRAMM JOSEPH POLONOVSKI CI. MOZZICONACCI Melle LEVY CHEYMOL BARGETON DEJOURS PARROT DJOURNO GOUGEROT KREIS
Bactériologie		Pat. expé riment.	
Biol. méd.			
Chimie méd.			
Dermato-syphil.			
Embryologie			
Histologie			
Hydrologie			
Hygiène			
Mal. infect.			
Médecine)		Pat. méd.	
légale et)			
du Trav.)			
Neurochir.			
Neurologie			
Obstétrique			
Ophtalmo-)		Pédiatrie	
logie)			
Orthopédie		Pharmacol.	
Oto-rhino-)			
laryngo.)			
Parasito.		Physiol.	
Parasito.col.			
Pat. chir.		Physique	
		médicale	
		Pneum.phthis.	

	MM.		MM.
Psychiatrie	(BARUK PICHOT	Stomato	(CHAPUT Mme CERNEA
Psych. infant.	MICHAUX	Urologie	KUSS
Rhumatologie	DELBARRE	Thérapeut.	CHASSAGNE

III.-- PROFESSEURS HONORAIRES
et AGREGES RAPPELES à l'EXERCICE
pour le Service des Examens.

MM. GATELLIER, LE LORIER, VAUDESCAL.

IV.-- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET
AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
A TITRE PERMANENT

	MM.		MM.
Clinique chir.	(AMELINE	Urologie	COUVELAIRE
	HUGUIER		(EROUET
	LEGER		DREYFUS
	PADOVANI		FAUVERT
	ROUX	Clinique mál.	HAGUENAU
	RUDLER		HAMBURGER
	(SICARD		KOURILSKY
Clinique } (	ECALLE		MARCHAL
obstét. } (	MAYER		(SOULIE
Clinique } (	OFFRET		
ophtal. } (	RENARD		

Secrétaire de la Faculté M. MOREL
Secrétaire-Adjoint Melle CHAINTEUIL

Bibliothécaire en Chef Dr HAHN
Conservateur Melle GOICHON
..... Melles DUMAITRE
Bibliothécaires. LE NOIR
..... METIN
..... QUIEVREUX

Par délibération en date du 9 décembre 1798,
l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans
les dissertations qui lui seront présentées,
doivent être considérées comme propres à
leurs auteurs et qu'elle n'entend leur don-
ner aucune approbation ni improbation.

A MES PARENTS,

Qui m'ont permis de pour-
suivre mes études ;

En témoignage de mon
affectueuse reconnaissance.

A MA SOEUR, A MON BEAU-FRERE,

A MA NIECE ET FILLEULE.

A MES AMIS.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550215_0023

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. FASQUELLE

Professeur de Bactériologie à la
Faculté de Médecine de Paris,

Il nous a inspiré le sujet de
ce travail et nous a fait
le grand honneur de nous
accueillir dans son labora-
toire.

En témoignage de notre très
respectueuse et profonde
reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. GASTINEL

Membre de l'Académie Nationale de
Médecine,
Officier de la Légion d'Honneur,

Nous tenons à le remercier
pour son enseignement
au cours supérieur de
Bactériologie et lui
exprimons notre respec-
tueuse admiration.

A Monsieur le Professeur A.R. PRÉVOT,

A Monsieur le Professeur P. LEPINE

En témoignage de gratitude
pour leurs leçons sur les
germes anaérobies et sur
les virus.

A Monsieur le Professeur P. SEDALLIAN,

A Monsieur le Professeur R. SOHIER,

Qui nous ont enseigné nos
premières notions de
Bactériologie,

Notre respectueux souvenir.

A Monsieur le Professeur A. NEVOT
A Monsieur le Professeur Agrégé D. CHRISTOL
A Monsieur le Professeur Agrégé P. BARBIER
A Monsieur le Professeur Agrégé P. TOURNIER

Nous les remercions de leur
enseignement et les assurons
de notre respect.

A Monsieur le Docteur F. POUTREL
A Monsieur le Docteur J. GAUTIER
A Monsieur le Docteur R. GALLAND

Dont les conseils nous furent
si utiles et la présence si
sympathique,

Nos sincères remerciements.

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE L'ACTION IN VITRO DE LA STREPTOMYCINE
SUR "BACTERIDIUM ANTHRACIS"

- 2 -

INTRODUCTION

En entreprenant ce travail, nous nous proposons d'étudier, in vitro, l'acquisition de la résistance à la streptomycine par le bacille charbonneux, entrevoyant le double aspect que ce germe présente dans ses cultures, à savoir que selon les conditions ambiantes, il adopte :

- soit un mode de vie asporogène ,
- soit un mode de vie sporogène,

ce dernier étant le mode habituel de comportement du bacille lorsqu'il végète en dehors d'un organisme vivant.

Les observations retirées des premiers essais nous conduisirent à envisager d'autres modalités de l'action de la streptomycine sur le bacille du charbon, en particulier,

- l'action de la streptomycine sur les spores,
- l'action de la streptomycine sur les formes végétatives, pour lesquelles il a fallu distinguer entre les formes végétatives en milieu permettant la sporulation et celles en milieu inhibant la sporulation.

Ainsi, avons-nous été amenés à apprécier l'influence de la streptomycine sur la sporulation.

Enfin, dans des conditions déterminées, nous avons observé l'apparition de colonies de bactériidies charbonneuses, morphologiquement très différentes de celles des bactériidies d'origine : les germes qui les composent, bien que d'aspect normal, présentent une évolution particulière que nous décrirons.

HISTORIQUE

—:—

C'est en 1850 que le bacille du charbon ou "Bactéridie de DAVAINÉ" fut décrit pour la première fois par cet auteur et son collaborateur RAYER, en ces termes :
"il y avait en outre dans le sang de petits corps filiformes ayant environ le double en longueur du globule sanguin" (n° 1).

Vingt-six années plus tard, en 1876, KOCH relate, dans un mémoire, que les petits éléments filiformes de DAVAINÉ peuvent passer à l'état de "corpuscules brillants après s'être reproduits par scission" ; d'autre part, que ces corpuscules peuvent "régénérer dans le sérum et l'humeur de l'oeil les petites baguettes pleines".
(n° 1)

PASTEUR, après avoir apporté des preuves irréfutables sur le rôle pathogène, alors discuté, de la bactéridie de DAVAINÉ dans l'affection charbonneuse, observe les spores ; il apporte la notion que la sporulation est un phénomène commun à de nombreuses bactéries et notamment au vibrion de la putréfaction (c'est-à-dire le vibrion septique ou *Clostridium septicum*) ; dans la séance du 16 juillet 1877 à l'Académie

des Sciences, il donne une description magistrale du cycle du bacille charbonneux : "ils sont en fils translucides, déliés, de longueur variable, se multipliant rapidement par scissiparité, ou bien on les trouve en amas de petits corpuscules brillants formés spontanément dans la longueur des articles filiformes, qui se séparent ensuite et constituent alors des amas de points paraissant inertes, d'où peuvent sortir, en réalité, d'innombrables légions d'individus filiformes, se reproduisant de nouveau par scissiparité, jusqu'à ce qu'ils se résorbent à leur tour en corpuscules-germes" (n° 1).

Dans le compte rendu de cette même séance, PASTEUR insiste sur le caractère de résistance de ces "corpuscules-germes" : ces éléments résistent à la dessiccation, à la température de 100 degrés, à l'alcool, à une pression de 10 atmosphères d'oxygène pendant 21 jours.

Une autre séance à l'Académie fut particulièrement importante, celle du 28 février 1881, dans laquelle PASTEUR décrit les moyens d'obtenir le vaccin anticharbonneux, constitué de germes à virulence atténuée : il cultivait, à cet effet, les bacilles en bouillon, dans le bouillon de boue, en atmosphère d'oxygène, et à la température de 42,5 degrés : cette température élevée avait l'intérêt d'écarter la population des germes, et d'offrir les bacilles sous leur forme végétative à l'action de l'oxygène qui atténuait leur caractère de virulence : dans de telles conditions, une culture de 8 jours perdait tout caractère de virulence vis-à-vis du cobaye, du lapin et du mouton, tout en conservant toutes ses propriétés immunisantes (n° 1).

Depuis PASTEUR, certes, le nombre des travaux sur la bactériodie charbonneuse a été considérable ; on connaît en particulier l'importance de ceux consacrés à l'étude antigénique par GRABAR, des races acapsulogènes par STERN, par STAUB et VIRAT (n° 2 et 3). Les recherches sur le cycle de la bactériodie ont été également fort nombreuses, toutes viennent confirmer le passage obligatoire du bacille par l'état de spore, après une phase de multiplication par scissiparité ; cependant, certains auteurs arrivent à empêcher ou plutôt à retarder la sporulation, soit en ajoutant certaines substances chimiques au milieu de culture (n° 4 et 5), soit en repiquant chaque jour dans un milieu neuf le germe en phase de multiplication (n° 7) ; cette dernière modalité, plus particulièrement, semble donner raison à la vieille notion qui prétend que la sporulation n'est qu'un moyen de défense, de résistance du germe à de mauvaises conditions de culture, entre autre à l'épuisement nutritif du milieu ; GRELET, étudiant la sporulation de "*Bacillus cereus*", dit : "la sporulation apparaît comme la réponse d'un bacille sain à l'épuisement de certains facteurs". (n° 6)

En 1954, les travaux de M. PITURRA (n° 7) résument de nombreuses observations antérieures concernant le cycle sporogène du bacille charbonneux et apportent des éléments nouveaux sur son cycle asporogène : l'auteur utilise le milieu d'Agar Tryptose Difco sur lequel "*bacteridium anthracis*" montre une inhibition à peu près totale de la sporogénèse pendant les 50 jours qui suivent l'ensemencement, et étudie comparativement le cycle sporogène du bacille par ensemencement d'un milieu d'Agar ordinaire ; essayons de schématiser les résultats

de ces travaux :

1 - Le cycle sporogène sur Agar ordinaire :
(voir la courbe n° 1)

Après une phase de latence, les germes se multiplient par duplication un grand nombre de fois ; puis arrive la période de repos qui comprend en premier lieu la diaphanisation des germes et finalement leur sporulation.

Il faut apporter une légère modification à cette courbe si, au lieu d'ensemencer des germes en phase de repos, on se sert de germes en phase de multiplication active (voir la courbe n° 2) : en effet, ces germes ensemencés se multiplient immédiatement, sans temps de latence et continuent à se diviser, pour, ensuite, évoluer vers la diaphanisation et la sporulation ; nous voyons donc que le repiquage sur un milieu neuf d'un germe en phase de multiplication, d'une part, supprime la phase de latence, d'autre part, retarde l'apparition des spores en prolongeant la phase de multiplication des germes repiqués.

2 - Le cycle sporogène sur le milieu
d'Agar Tryptose Difco :
(voir la courbe n° 3)

- Pendant les 24 premières heures, l'évolution est la même que sur l'agar ordinaire : temps de latence, phase de multiplication ; l'auteur obtient, ici encore, la suppression du temps de latence et le prolongement de la phase de multiplication en repiquant les germes dans leur phase de division active.

- Les différences apparaissent au moment de l'installation de la phase de repos ; d'après M. PITZURRA, après la phase de multiplication active,

- 98,6 % des germes arrêtent leur multiplication, se diaphanisent ; très rares sont les bacilles qui vont sporuler, la plupart seront lysés et détruits.
- 1,4 % seulement des bactériidies continuent à se diviser et donnent naissance aux "formes anormales" : ce sont généralement des chaînes bacillaires à disposition spiralée, enroulée, aboutissant parfois à la formation d'amas bacillaires ; les bacilles qui constituent ces chaînes sont très déformés, ils sont trapus, parfois piriformes ou bien présentent des angulations, des irrégularités de diamètre.

Une culture de 50 jours sur le milieu d'Agar Tryptose Difco montre :

- d'une part, les chaînes anormales intensément colorées,
- d'autre part, la grande masse de chaînes diaphanes en voie de disparition, correspondant aux 98,6 %.
- aucune spore n'est reconnaissable ni dans les unes ni dans les autres.

Les bacilles anormaux sont capables de se reproduire identiques à eux-mêmes, sans temps de latence, lorsqu'on les repique ; ici l'auteur distingue deux modalités :

- le repiquage sur l'Agar ordinaire,
- le repiquage sur l'Agar Difco.

1 - Repiquées sur l'Agar ordinaire, dans les premiers jours de leur apparition, les formes anormales sont susceptibles de se multiplier identiques à elles-mêmes. Mais, dès la 6ème heure suivant le repiquage, ces formes anormales arrivent dans leur phase de repos et l'on observe leur diaphanisation et l'apparition à leur intérieur des spores qui, lorsqu'elles germeront, donneront des formes végétatives normales.

2 - Repiquées sur l'Agar Difco, les formes anormales sont capables de se multiplier identiques à elles-mêmes pendant 50 jours ; passé ce délai, et si on les repique sur un milieu de Difco vierge, elles évoluent vers la dissémination et la sporulation, et là encore, les spores germeront en donnant des formes végétatives normales qui, par suite de la persistance des conditions de culture asporogène, évolueront vers une nouvelle dissociation : d'une part, bacilles ne pouvant pas se reproduire, d'autre part bacilles anormaux.

M. FITZURRA étudie simultanément le devenir des 98,6 % de germes qui sont incapables de se multiplier et sont en voie de lyse ; il constate que :

- lorsqu'il les repique sur l'Agar ordinaire, peu de temps après leur apparition sur l'Agar Difco, ces bacilles diaphanes évoluent vers la lyse ; toutefois, quelques uns, rares, présentent une sporulation et montrent une heure après le repiquage, une germination de leur spore, germination qui aboutit à la formation de chaînettes de bacilles normaux.

- dans le cas où ils restent sur le milieu Difco, milieu inhibant la sporogénèse, les

98,6 % de germes évoluent vers la lyse et la disparition complète sans aucune sporulation.

En résumé, il ressort de ces études que "la reprise de l'activité reproductrice de la bactériodie charbonneuse n'est possible que par l'intermédiaire de la spore" et ceci aussi bien pour les formes végétatives normales que pour les formes anormales du cycle asporogène. Ces travaux ont permis d'interpréter, comme nous le verrons, certains faits que nous avons observés chez les germes qui végètent à la température de 42,5 degrés.

En ce qui concerne l'action de la streptomycine sur "*Bacteridium anthracis*", la plupart des rapports publiés depuis une quinzaine d'années sont des observations cliniques chez l'homme ou l'animal et traitent de la sensibilité in vivo du bacille charbonneux à la streptomycine. Il faut signaler toutefois :

- le travail de C. LEVADITI et J. HENRY sur les modifications morphologiques et tinctoriales de la bactériodie charbonneuse soumise à l'action de la streptomycine (n° 8).

- celui de C. MELANIDIS et C. ZARIFOPOULOS sur l'action bactériolytique de la streptomycine sur le bacille du charbon (n° 9),

- enfin, l'ouvrage sur la streptomycine publié chez MASSON en 1949 par M. MORIN, J. NEHLIL et R. PICHON (n° 10) qui, bien que n'envisageant pas le cas particulier de l'action de la streptomycine sur

"bacteridium anthracis", nous a renseigné sur les effets de cet antibiotique sur les germes en général, les auteurs signalent notamment :

- l'action bactériostatique de la streptomycine à faible concentration,
- son effet bactéricide à concentration élevée,
- sa pénétration dans les germes en phase de multiplication.

Ils font en outre une série de remarques intéressantes sur les variations de la sensibilité des germes à la streptomycine :

- variation de la sensibilité avec la méthode de recherche utilisée (milieu solide ou liquide),
- variation avec les conditions dans lesquelles il distingue :

a) les souches sensibles,

b) les souches moins sensibles, subissant l'effet bactériostatique à un degré moindre que les précédentes et résistant à l'effet bactéricide de l'antibiotique ; par suite de l'infime quantité de germes qui les représentent dans la population microbienne, ils ne se manifestent dans les cultures qu'après plusieurs jours d'étuve ; ce sont ces germes que l'on appelle "les survivants".

c) Les souches résistantes d'emblée à l'antibiotique ; dans ce cas, l'antibiotique joue alors un rôle de sélection, dans la population microbienne, du germe mutant résistant.

- la sensibilité d'une souche n'est pas immuable ; les auteurs

observent assez fréquemment, dans le traitement des infections par les antibiotiques, des souches sensibles qui, secondairement, deviennent résistantes.

- Enfin, la sensibilité d'une souche varie avec la composition du milieu de culture : sur un milieu riche, les germes sont généralement plus résistants à l'antibiotique.

Un autre travail a encore retenu particulièrement notre attention : il s'agit des recherches de R. LINZ et E. LECOCQ "sur l'influence de la streptomycine sur la multiplication des bactéries, dites résistantes à son action bactériostatique" : ces auteurs rapportent que les germes, bien que résistants, sont gênés dans leur développement par la présence de l'antibiotique : cette gêne se traduit par une multiplication plus lente des corps microbiens. (n° 11)

ANALYSE DES EXPERIENCES ET DE LEURS RESULTATS

—•—

Pour la clarté de l'exposé, nous classerons les observations en deux chapitres distincts :

- le premier aura trait à l'acquisition in vitro de la résistance à la streptomycine,

- l'autre envisagera l'action de la streptomycine sur "bacteridium anthracis" et sur la sporulation ; il relatera, en outre, certains faits particuliers observés au cours de cette étude.

—•—

CHAPITRE I

L'ACQUISITION IN VITRO DE LA RESISTANCE A LA STREPTOMYCINE

-:-

Technique :

- Nous employons la streptomycine R.P., présentée en flacon d'1 gramme (soit un millions d'unités (U)) que nous diluons avec 5 cc d'eau physiologique stérile, ce qui donne finalement une solution de streptomycine dont la concentration est de 200.000 U par cc.

- Pour l'appréciation de la sensibilité du bacille du charbon à la streptomycine, nous employons "la technique de dilution de l'antibiotique en milieu liquide" ; nous diluons la streptomycine dans un bouillon ordinaire, milieu qui normalement donne en 24 heures et à 37 degrés une culture abondante de bacilles charbonneux (n° 12).

Nous faisons plusieurs gammes de dilutions, comprenant chacune 12 tubes et dont les concentrations en streptomycine s'échelonnent de 80 U par cc à 0,07 U par cc :

- 80 U - 40 U - 20 U - 10 U - 5 U -
- 2,5 U - 1,25 U - 0,6 U - 0,3 U -
0,15 U - 0,07 U - le 12ème tube, témoin,
sans streptomycine.

Le volume de bouillon streptomyciné contenu dans chaque tube est fixé à 2,5 cc ; nous opérons de la façon suivante :

- En premier lieu une dilution mère de streptomycine à 20000 U par cc est préparée en mélangeant
 - à 0,1 cc de la solution initiale de streptomycine à 200.000 U par cc
 - à 9,9 cc d'eau physiologique ou de bouillon.
- Dans le premier tube nous mesurons 0,2cc de la dilution mère à 2.000 U par cc et ajoutons 4,8 cc de bouillon ce qui donne la concentration souhaitée à 80 U par cc.
- Du 2ème au 12ème tube nous répartissons, dans chaque tube, 2,5 cc de bouillon ordinaire et, ensuite, 2,5 cc du mélange streptomyciné du tube qui le précède, par exemple :
 - dans le 2ème tube, on incorpore 2,5 cc du mélange du 1er tube,
 - dans le 3ème tube, 2,5 cc du 2ème tube,
 - et ainsi de suite jusqu'au 11ème tube, le 12ème tube, témoin, ne doit pas contenir de streptomycine et ne reçoit pas les 2,5 cc du 11ème tube ; ces 2,5 cc seront jetés afin que tous les tubes contiennent le même volume de milieu streptomyciné.

Une fois les gammes réalisées, chaque tube est ensemencé avec une quantité fixe de culture microbienne : 5 gouttes d'une

culture en bouillon de 24 heures à 37 degrés.

Enfin les gammes sont portées, les unes dans l'étuve à 37 degrés, les autres dans l'étude à 42,5 degrés.

Les gammes sont observées toutes les 24 heures : la culture des bacilles charbonneux est appréciée macroscopiquement : on note chaque jour le tube qui, contenant la plus forte concentration de streptomycine, pousse et donne à l'agitation un trouble du milieu : ce "premier tube qui pousse" correspond à la dose infrabactériostatique de l'antibiotique.

Avec le contenu de ce tube, nous réensemencions quotidiennement de nouvelles gammes de dilutions de streptomycine.

Résultats obtenus :

Ils sont grossièrement schématisés par la courbe n° 4 à la température de 37 degrés et la courbe n° 5 à la température de 42,5 degrés.

De cette étude sur l'acquisition de la résistance à la streptomycine, nous avons retiré un certain nombre de renseignements :

1 - Les bacilles se sont révélés beaucoup plus sensibles à la streptomycine, à la température de 42,5 degrés qu'à la température de 37 degrés :

- à 37 degrés "le premier tube qui pousse" est celui qui contient la concentration de 1,25 U par cc de streptomycine,

- à 42,5 degrés, c'est le tube contenant 0,07 U par cc.

2 - Que ce soit à 37 degrés ou à 42,5 degrés, l'acquisition de la résistance à la streptomycine s'est réalisée lentement, par paliers successifs, c'est le type classique de "résistance à plusieurs échelons", habituellement rencontré avec la pénicilline et non avec la streptomycine.

3 - On a noté à 42,5 degrés comme à 37 degrés une évolution très particulière qui est mal traduite par les courbes : il s'agit de récupérations brusques mais passagères de la sensibilité des germes à l'antibiotique ; cela se manifeste d'une façon assez régulière tous les 6 ou 7 jours : alors que nous avons des bacilles résistants, par exemple à 10 U par cc, brusquement le lendemain, la nouvelle gamme, faite avec ces bacilles résistants à 10 U, montre une culture seulement dans les premiers tubes contenant des doses de streptomycine très inférieures à 10 U par cc ; mais les nouvelles gammes réensemencées avec ces germes néosensibles, si l'on peut dire, montrent un retour au taux de résistance de l'avant-veille et quelquefois même à un taux supérieur. Dans le chapitre suivant, nous essaierons d'expliquer ces faits à l'aide des résultats d'expériences qui seront rapportés ultérieurement. Notons toutefois, immédiatement, que l'arrêt brusque de culture de ces tubes, apprécié à l'oeil nu, est confirmé par l'examen microscopique des étalements de ces tubes, colorés avec le bleu de méthylène, examen qui ne montre aucune forme bacillaire ; or ces tubes ne sont pas stériles ; ils doivent contenir des spores isolées, invisibles à la coloration au bleu de méthylène ;

en effet si l'on étale sur des milieux de culture solides, dépourvus de streptomycine, ces tubes apparemment stériles, on obtient la culture d'assez nombreuses colonies de "bacteridium anthracis", ayant vraisemblablement pour origine les spores contenues par ces tubes ; d'autre part, l'ensemencement d'une culture en bouillon de 24 heures de ces germes poussés sur milieu solide, dans une gamme de dilutions de streptomycine, montre la récupération de la résistance à l'antibiotique.

4 - Chaque jour, nous isolons sur des tubes de géloses inclinées ordinaires, les germes qui végètent dans le tube que l'on appelle "le premier tube qui pousse", pour nous assurer que le trouble du bouillon ne résulte pas de la pullulation d'une souillure. Or, à l'occasion de ces multiples étallements, nous constatons que les colonies de bactériidies charbonneuses, ayant acquis la résistance à la streptomycine, poussent avec un caractère particulier : elles sont de taille plus petite que les colonies du germe qui n'a jamais subi l'influence de la streptomycine et cela, aussi bien à 42,5 degrés qu'à 37 degrés. Ce caractère de petite taille semble s'accentuer à mesure que les bacilles augmentent leur taux de résistance : ainsi, les colonies du bacille charbonneux qui a acquis une résistance à 80 U par cc de streptomycine, n'ont que 1,5 mm à 2 mm de diamètre, après un séjour de 24 heures à 37 degrés :

- ce caractère de petite taille se conserve lors des repiquages sur d'autres géloses non streptomycinées.

- Abandonnées à l'étuve à 37 degrés, les petites colonies grossissent et atteignent

en 48 heures environ, la taille des colonies que le bacille charbonneux d'origine, indemne de streptomycine, présente en 24 heures.

- Ces petites colonies grossies, repiquées, donnent à nouveau les petites colonies.

- L'étude microscopique ne montre aucune différence morphologique entre ces bacilles résistants et les bacilles indemnes de streptomycine. Par contre, sur gélose à 37 degrés on note un léger retard de la sporulation des germes résistants : alors que le bacille indemne de streptomycine donne de très nombreuses et grosses spores en 24 heures, les bactériidies qui constituent les petites colonies, n'ont au bout du même temps que de rares et petites spores.

- L'étude biochimique comparative des bacilles résistants et des bacilles d'origine, n'ayant jamais subi l'action de l'antibiotique, donne des résultats identiques pour les deux germes :

- pas de production d'indole en eau peptonée,
- liquéfaction de la gélatine,
- pas de noircissement de la gélose au plomb,
- ils fermentent le glucose et le maltose et n'attaquent pas le lactose, la mannite, la dulcité, l'arabinose.

- Il nous restait à apprécier si le caractère de "petite taille", d'une part, et la résistance à la streptomycine, d'autre part, se conservaient après la sporulation sur un milieu dépourvu de streptomycine :

pour cela, une culture sur gélose ordinaire de bactériidie charbonneuse à colonies modifiées par la streptomycine est laissée à la température du laboratoire pendant 2 mois ; au bout de ce délai, les colonies ne sont constituées que par des spores :

a) lorsqu'on repique ces spores sur une gélose ordinaire, elles engendrent de nouveau des colonies de taille restreinte ; donc la morphologie des colonies à taille réduite n'est pas modifiée par la sporulation.

b) En ce qui concerne le caractère de résistance à l'antibiotique, l'ensemencement d'une gamme de dilutions de streptomycine, avec une culture en bouillon de 24 heures à 37 degrés de ces germes qui ont séjourné 2 mois à la température du laboratoire, donne de nouveau un taux de résistance à 80 U par cc : donc la sporulation en milieu non streptomyciné, conserve le caractère résistant du germe. Par contre, l'ensemencement de la gamme de dilutions, avec les spores de ces germes résistants à 80 U par cc, montre, après 24 heures d'étuve à 37 degrés, une culture seulement dans les tubes contenant 5 U par cc ou des doses inférieures d'antibiotique : les variations de sensibilité du germe à l'antibiotique, selon qu'il se trouve à l'état bacillaire ou à l'état de spore, seront expliquées par les résultats expérimentaux rapportés dans le chapitre suivant.

5 - Enfin, les germes qui croissent et se multiplient dans "le premier tube qui pousse", se montrent évidemment résistants à la dose de streptomycine que contient ce tube ; mais, réensemencés

dans une nouvelle gamme de dilutions de streptomycine, ils apparaissent sensibles, au taux de streptomycine immédiatement supérieur : autrement dit, ils ne présentent pas de "gain de résistance".

CHAPITRE II

L'ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR "BACTERIDIUM ANTHRACIS" ET SUR SA SPORULATION

—:—

Cette étude fut menée simultanément à celle de l'acquisition de la résistance : tout d'abord, nous pensions seulement essayer d'élucider l'action de la streptomycine sur la sporulation de la bactériodie. Puis, les faits observés dans les gammes de résistance d'une part, d'autre part les colonies de bacilles charbonneux qui apparaissent à l'étalement, sur gélose, des tubes contenant des doses bactériostatiques d'antibiotique, et ne montrant aucune végétation microbienne ni à l'oeil nu, ni à l'examen microscopique, nous engagèrent à envisager l'action de la streptomycine sur le bacille du charbon, à la fois sur ses formes végétatives bacillaires et sur ses spores.

Les faits expérimentaux seront rapportés dans l'ordre indiqué dans l'introduction :

1 - Action de la streptomycine sur les spores des bactériodies et sur leurs formes

bacillaires.

2 - L'influence de l'antibiotique sur la sporulation.

3 - La description de faits particuliers observés au cours des recherches relatées dans ce deuxième chapitre.

Sur le plan technique, nous avons utilisé la même méthode des gammes de dilutions en bouillon de la streptomycine ; mais quelques modifications furent apportées :

a) en particulier, bien qu'il s'agisse toujours, pour la commodité, de gammes de 12 tubes, la différence des concentrations en streptomycine, entre le 1er et le dernier tube, est plus grande, ceci afin de permettre de distinguer l'effet bactériostatique et l'effet bactéricide de l'antibiotique ; ainsi, les gammes contiennent, sous un volume constant toujours égal à 2,5 cc pour chaque tube, les concentrations suivantes :

2.000 U - 1.000 U - 100 U - 10 U - 5 U - 2,5 U - 1,25 U - 0,6 U - 0,3 U - 0,15 U - 0,07 U - et toujours le tube témoin sans streptomycine.

b) D'autre part, nous ne repiquons pas quotidiennement sur des gammes neuves ; les gammes sont laissées dans les étuves à 37 degrés et à 42,5 degrés et observées chaque jour.

c) Nous réalisons trois groupes de tubes, comprenant chacun deux gammes dont l'une sera placée à l'étuve à 37 degrés et l'autre dans l'étuve à 42,5 degrés (n° 32) :

- Le 1er groupe est ensemencé avec une suspension de spores de bactériidies, prélevées dans une culture sur gélose ayant séjourné deux mois à la température du laboratoire et ne montrant, après étalement, fixation à l'alcool et coloration, aucune forme bacillaire.

- Le 2ème servira à apprécier l'action de la streptomycine sur les formes végétatives du bacille ; nous répartissons dans les deux gammes de ce groupe une culture du bacille du charbon en bouillon : il s'agit d'une culture de trois jours à l'étuve à 37 degrés, qui, en fait, en même temps, que les formes végétatives, présente une grande quantité de spores.

- Enfin le 3ème groupe reçoit lui aussi des formes végétatives, mais il s'agit, cette fois, d'une culture de bacilles, en bouillon, ayant végété à 42,5 degrés pendant trois jours.

d) Sur ces trois groupes de gammes sont réalisés trois examens successifs :

1) une lecture macroscopique, journalière, qui permet de noter la résistance des germes à l'antibiotique et vient confirmer les résultats obtenus lors de l'étude de l'acquisition de la résistance à la streptomycine.

2) un examen microscopique des tubes, qui appréciera le rôle joué par la streptomycine sur la sporulation ; cet examen microscopique est pratiqué de la façon suivante :

- chaque jour on prélève à la pipette Pasteur une goutte du fond de chaque tube ;

- Cette goutte est étalée sur une lame, et colorée après fixation à l'alcool.

En ce qui concerne la coloration, en raison du grand nombre de colorations qui sont à faire chaque jour, nous utilisons la coloration simple au bleu de méthylène ; elle permet de voir très bien les formes végétatives de la bactériémie et les spores qui apparaissent comme des trous incolores au sein des corps bacillaires ; par contre elle est défailante dans le cas où, la sporulation étant très avancée, il ne reste des germes que les pores, la substance des bacilles ayant disparu ; dans ce cas, nous avons essayé la coloration de MOELLER, mais par suite des nombreux artéfacts créés par les gouttelettes de bouillon de la préparation, il est très difficile d'affirmer la présence de spores isolées ; pour éliminer ces artéfacts dus au bouillon, l'essai de lavages répétés à l'eau physiologique, suivis de centrifugation, n'a pas apporté d'amélioration notable des préparations : les artéfacts persistaient encore, en moins grand nombre, certes, mais suffisants pour gêner la lecture des lames colorées selon la méthode de MOELLER. Nous en sommes donc restés à la coloration au bleu de méthylène ; nous savons qu'avec cette seule coloration, il est impossible d'apprécier l'action bactéricide de la streptomycine sur les spores isolées ; nous avons pallié cette déficience technique par la pratique d'un troisième examen :

3) L'étaloment, sur des milieux solides de bouillon de streptomycine, du contenu des tubes en croissance aux doses bactériostatiques d'antibiotique : Ces étaléments permettent de se rendre compte, si les tubes qui ne poussent pas à l'oeil

nu et parallèlement ne montrent aucune forme bacillaire à l'examen microscopique, sont stériles ou non :

- la stérilité des tubes traduira l'effet bactéricide de la streptomycine ;
- par contre, les tubes qui, à l'étalement, donneront naissance à des colonies, mettront en lumière le caractère de résistance des spores à l'antibiotique ; il s'agit bien de la résistance des spores : en effet, l'examen microscopique n'avait montré aucune forme bacillaire.

I.- L'ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR LES SPORES ET LES FORMES VEGETATIVES DE "ACTERIDIUM ANTHRACIS"

A/- L'examen macroscopique des gammes :

Nous lisons macroscopiquement les gammes toutes les 24 heures et notons "le premier tube qui pousse" ; les résultats de cette lecture sont traduits sur les courbes suivantes :

a) Les gammes ensemencées avec les spores : (voir la courbe n° 6)

- à l'étuve à 37 degrés

- Les résultats :

- Les deux premiers jours, culture dans les tubes à 0,07 U et 0,15 U par cc de streptomycine.
- Le troisième jour et les jours suivants, apparaît en plus une culture dans le tube à 0,30 U par cc.

- L'interprétation :

Les spores n'arriveraient pas à germer pour la grande majorité d'entre elles à un taux supérieur à 0,15 U par cc ; toutefois, quelques unes, rares, germent au taux de 0,30 U et ce sont elles qui seraient à l'origine des cultures macroscopiques tardives du 3ème jour.

- A l'étuve à 42,5 degrés :

- Les résultats :

- Les deux premiers jours une culture est notée seulement dans le tube contenant 0,07 U par cc.

- A partir du troisième jour, apparaît une culture dans le tube à 0,15 U par cc.

- L'interprétation :

Les spores qui germent, comme nous le verrons lors de l'étude microscopique donnent des formes végétatives anormales. Or, ces formes anormales, nous l'avions constaté lors de l'étude de l'acquisition de la résistance à la streptomycine, ne résistent qu'au taux de 0,07 U par cc d'antibiotique ; la culture tardive du 3ème jour peut être expliquée par la présence de quelques rares formes anormales se montrant résistantes à 0,15 U.

b) Les gammes ensemencées avec les formes résistives à 37 degrés après trois jours à 37 degrés :
(voir en annexe n° 7)

Une culture en bouillon de trois jours à 37 degrés, est constituée, comme l'a montré l'examen microscopique,

- de chaînes bacillaires en phase de multiplication, dépourvues de spores,
- mais surtout de bacilles sporulés.

= A l'étuve à 37 degrés

- Résultats et interprétation :

Le premier jour, la culture a lieu jusque dans le tube contenant le taux de 0,15 U ; le 2ème jour tous les tubes depuis 0 U jusqu'à 1,25 U compris, ont poussé : 1,25 U semble être le taux de résistance des formes végétatives ; nous avons déjà trouvé cette valeur lors de nos premières recherches, mais alors le bacille charbonneux se montrait résistant à 1,25 U d'emblée au bout de 24 heures. Or, les gammes, faites pour l'acquisition de la résistance, avaient été ensemencées avec une culture en bouillon à 37 degrés de 24 heures seulement, ne contenant par conséquent pas ou peu de spores, et essentiellement constituée de formes bacillaires en multiplication. La poussée tardive, à 48 heures, obtenue cette fois, vient de la faible proportion de formes végétatives présentes dans la culture de trois jours où prédominent les spores : ces spores, nous le savons, ne peuvent germer au dessus de 0,15 - 0,30 U ; ceci explique la poussée première dans les tubes 0,15 et 0,07 U qui seuls permettent la germination des spores (n° 30 - 31).

= A l'étuve à 42,5 degrés :

- Résultats et interprétation :

Limitée par la germination des spores et surtout par la grande sensibilité des formes anormales qui apparaissent à cette température, la gamme pousse d'emblée jusqu'au tube contenant 0,15 U par cc de streptomycine, taux de sensibilité, nous

l'avons vu, de ces formes anormales.

- c) Les gammes ensemencées avec les formes végétatives, sont développées à 42,5 degrés pendant trois jours :
(voir courbe n° 8)

Cette culture se montre composée, à l'examen microscopique, essentiellement de formes anormales, identiques à celles décrites par M. PITZURRA dans les milieux asporogènes (n° 7).

Résultats :

- à 37 degrés :

À partir du premier jour et dans les jours qui suivent, nous observons une culture jusque dans le tube ayant 0,15 U par cc de streptomycine.

- à 42,5 degrés :

Ici aussi, dès le premier jour et par la suite, seul le tube contenant 0,07 U par cc, donne une culture visible à l'oeil nu :

Interprétation :

Que ce soit à 37 degrés ou à 42,5 degrés, dans les deux cas, nous faisons agir la streptomycine sur des formes végétatives du type anormal, donc très sensibles à l'antibiotique ; nous comprend-on que seuls les deux premiers tubes des gammes puissent pousser ; les résultats viennent confirmer ceux trouvés lors de l'étude de l'acquisition de la résistance : les cultures à 42,5 degrés, de bactériidies charbonneuses se montrent beaucoup plus sensibles que celles ayant lieu à 37 degrés.

Nous avons recommencé plusieurs fois ces gammes et chaque fois nous avons obtenu des résultats similaires, compte tenu des variations observées :

- dans la germination des spores, qui germent pour la plupart à 0,15 U par cc, mais dont quelques-unes germent encore à 0,30 U,

- et dans la résistance des formes végétatives dites "anormales" des cultures faites à 42,5 degrés, dont le plus grand nombre résiste à 0,07 U, mais dont quelques unes résistent encore à 0,15 U.

On peut penser que ces variations de sensibilité sont peut-être dues au fait qu'une population microbienne, composée d'une multitude d'individus bactériens, comprend quelques germes légèrement plus résistants à la streptomycine que la grande masse des autres ; lors de l'ensemencement des tubes, le hasard peut faire que l'on introduise dans les tubes une quantité relativement importante de ces germes un peu plus résistants, ce qui se traduira par une culture en 24 heures dans le tube dont le taux de streptomycine correspond à celui de la résistance de ces bacilles ; au contraire, lorsque le hasard veut que ces germes un peu plus résistants ne soient qu'en nombre infime dans l'ensemencement, le tube, correspondant aux taux de leur résistance, ne montrera une culture qu'après le troisième jour.

B/- L'examen microscopique des gammes :

Pratiqué quotidiennement, nous l'avons dit, sur une goutte du contenu de chaque tube, étalée sur une lame, fixée à l'alcool

et colorée avec le bleu de méthylène, nous observons :

a) Dans les tubes contenant des doses infrabactériostatiques d'antibiote:

Qu'il s'agisse des tubes ayant été à 37 degrés ou de celles placées à l'étuve à 42,5 degrés, l'examen microscopique ne montre aucune différence entre le tube dépourvu de streptomycine et ceux contenant des doses infrabactériostatiques de streptomycine : nous voyons dans les deux cas des bacilles normaux ou anormaux dans les tubes placés à 42,5 degrés ; une seule différence se manifeste, comme nous le signalerons plus loin, dans le temps de sporulation des bacilles.

Aucune modification morphologique des germes, sous l'influence de la streptomycine, n'a été observée ; aucune "forme géante" n'a été vue, pouvant rappeler le "cycle N" des bacilles charbonneux, décrit par MINCK sur des bacilles mis en présence de pénicilline (n° 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18).

Il faut noter que les examens microscopiques quotidiens des tubes contenant des doses infrabactériostatiques, ont permis de constater à deux reprises, un arrêt de culture, se traduisant au microscope par la disparition des germes sous leur forme bacillaire ; les deux fois cet arrêt a été observé après le 5ème jour d'étuve à 37 degrés, dans "le premier tube poussant", contenant 1,25 U par cc de streptomycine : tout se passe comme si ce bouillon streptomyciné à 1,25 U par cc possédait un certain potentiel nutritif, potentiel qui serait inférieur à celui du tube dépourvu

de streptomycine qui, nous le verrons, montre encore des germes en phase de multiplication après 12 jours d'étuve ; les éléments nutritifs du tube de bouillon streptomyciné à 1,25 U permettraient une culture de la bactériodie sous sa forme végétative pendant 5 jours ; après ce délai, il y aurait épuisement du milieu, qui aboutirait à la sporulation définitive des bacilles.

Cette notion d'épuisement nutritif, d'une part, d'autre part, le fait, nous l'avons vu, que les spores ne peuvent pas germer à des taux de streptomycine supérieurs à 0,30 U par cc, vont permettre d'émettre une hypothèse pouvant expliquer le fait observé dans les gammes d'acquisition de la résistance, à savoir "les brusques arrêts de culture", se traduisant par un aspect de récupération de la sensibilité des germes et se reproduisant régulièrement tous les 6 à 7 jours ; nous avons vu que les tubes, qui montraient cet aspect de néosensibilité à l'antibiotique, n'étaient pas stériles ; ils contenaient des spores qui, lorsqu'on les repiquait sur des milieux non streptomycinés, germaient et donnaient des bacilles qui, réensemencés dans une gamme de dilutions de streptomycine, se montraient à nouveau résistants. La récupération apparente de leur sensibilité à la streptomycine correspondrait donc à la sporulation des germes résistants ; dans l'acquisition de la résistance à la streptomycine, le repiquage quotidien du "premier tube qui pousse" sur des gammes neuves streptomycinées apporterait de nouveaux éléments nutritifs et retarderait la sporulation définitive et totale de la culture, par prolongement de la phase de multiplication des formes végétatives

des bactériidies : dans ce cas, la sporulation définitive a lieu vers le 6 ou 7ème jour alors que dans le tube à 1,25 U qui n'était pas repiqué, elle se produisait le 5ème jour. Le fait que les spores ne peuvent germer, pour redonner des formes bacillaires, qu'en présence de taux de streptomycine très inférieurs au taux de la résistance des formes végétatives, explique que les premiers tubes de la gamme, contenant peu de streptomycine poussent toujours, même lorsque les autres tubes montrent l'aspect de la récupération de la sensibilité à l'antibiotique : en effet, dans ces premiers tubes, les spores peuvent germer et donner une culture de bactériidies charbonneuses.

Nous savons enfin que le pouvoir germinatif des spores en milieu streptomyciné est augmenté pour les spores provenant de germes ayant acquis la résistance à la streptomycine : toutefois, les taux de streptomycine où peuvent germer les spores, restent toujours très inférieurs au taux de résistance des formes végétatives bacillaires : ainsi, nous avons vu que, le germe ayant acquis une résistance à 80 U par cc de streptomycine, donnait des spores qui étaient susceptibles de germer jusqu'au taux de 5 U par cc compris.

b) Dans les tubes ayant des concentrations bactériennes faibles de streptomycine :

Nous remarquons au microscope, aussi bien à 37 degrés qu'à 42,5 degrés :

- l'absence de formes bacillaires normales à 37 degrés, ou de formes anormales à 42,5 degrés ;

- seules sont présentes des chaînes à aspect très disloqué, à coloration inégale, correspondant aux bacilles sensibles en voie de lyse et qui finiront par disparaître complètement ; la lyse et la destruction de ces chaînes bacillaires ont lieu d'autant plus rapidement que la teneur du tube en streptomycine est plus élevée ;

- au sein de ces chaînes en dislocation, quelques petites spores semblent être visibles : incolores, elles ont une certaine brillance ; la présence de spores sera confirmée par les étalements des tubes sur milieu solide.

Cet examen microscopique nous renseigne sur les effets bactériostatiques et bactéricides de la streptomycine sur les formes bacillaires de la bactériodie charbonneuse, par contre, il ne fournit aucun renseignement sur l'action de l'antibiotique sur les spores ; pour cela, il faut faire appel à un troisième examen :

C/- L'étalement, sur des milieux solides dépourvus de streptomycine, des tubes contenant des doses bactériostatiques d'antibiotique :

Chaque colonie, qui apparaîtra sur ces milieux, correspondra à une spore, ayant résisté à l'action bactéricide de la streptomycine.

Nous étalons les tubes apparaissant stériles après un séjour de 8 jours à l'étuve.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-contre.

a) Les ~~colonies~~ ~~non streptomycines~~ : les spores :

A 42,5 degrés, comme à 37 degrés, les tubes se montrent fertiles jusqu'à la teneur de 10 U par cc de streptomycine. Au-delà, les tubes étalés ne donnent aucune culture : autrement dit, les spores sont détruites par les doses de streptomycine supérieures à 10 U par cc. Il faut noter que les colonies qui apparaissent sur ces milieux non streptomycines, sont identiques à celles des bacilles n'ayant jamais été en contact avec l'antibiotique, d'autre part, que le nombre de ces colonies va en diminuant à mesure que l'on approche du tube limite à partir duquel il n'y a plus de culture à l'étalé : 10 U par cc semble donc être la résistance extrême de quelques rares spores. Ces deux notions sont valables pour les gammes suivantes.

La première constatation est intéressante : les spores qui ont résisté à de fortes concentrations d'antibiotique, redonnent des colonies de type normal et qui plus est, si l'on recherche la sensibilité de ces germes à la streptomycine, en les ensemençant dans une gamme de dilutions croissantes de l'antibiotique, on trouve qu'ils ont la même résistance que les bactériidies d'origine n'ayant jamais été en contact avec la streptomycine, d'autre part, les spores de ces bacilles ne présentent pas non plus d'augmentation de leur pouvoir germinatif : tout se passe comme si la spore qui résiste aux doses bactériostatiques, ne se laissait pas pénétrer par l'antibiotique, plusieurs auteurs décrivent une membrane sporale : peut-être la résistance de la spore est-elle fonction de l'épaisseur, de la solidité de cette membrane ? (n° 19 - 20 - 21 - 22).

+ = tubes où les spores ont résisté à l'action bactéricide de la streptomycine.

(1) $\frac{1}{2}$ (2) $\frac{1}{2}$ (3) $\frac{1}{2}$ (4) $\frac{1}{2}$ (5) $\frac{1}{2}$

b) Les gammes faites avec le bouillon de trois jours à 37 degrés :

- A 37 degrés, tous les tubes contenant une dose de streptomycine supérieure à 1,25 U par cc, taux de résistance du germe sous sa forme végétative, se montrent stériles.

- A 42,5 degrés, il en est de même ici, les tubes restent stériles au-dessus de 1,25 U ; mais ici le taux de résistance du germe, sous sa forme végétative anormale, n'est égal qu'à 0,15 U.

Comment expliquer ces faits ? Deux hypothèses s'offrent :

- Ou bien les spores contenues dans les bacilles qui ont servi à l'ensemencement des gammes, étant des spores jeunes, néoformées, sont plus fragiles. Cette hypothèse a pour elle le fait qu'à 42,5 degrés, nous avons aussi des colonies jusqu'au taux de 1,25 U. Il y aurait donc lieu de distinguer un taux de sensibilité des jeunes spores.

- Ou bien le bouillon de trois jours à 37 degrés, qui sert à l'ensemencement, ne contiendrait aucune véritable spore ; en effet, on peut penser que les spores, sitôt apparues, germeraient à nouveau et que, par conséquent, l'antibiotique agirait toujours sur des spores en voie de germination qui auraient la même sensibilité que les formes végétatives ; ceci correspondrait avec les faits que nous rapporterons ultérieurement, à savoir qu'une culture en bouillon dépourvu de streptomycine, montre ses premières spores au bout de 48 heures, mais qu'après 12 jours

d'étuve à 37 degrés elle présente encore des chaînes de bacilles sans spores, mélangées évidemment à des bacilles sporulés ; tout se passe comme si les spores, apparaissant au sein des bacilles germaient de nouveau dans le bouillon ; le bouillon, étant un milieu liquide, permettrait peut-être une sorte de repiquage automatique, limité toutefois à la longue par l'épuisement nutritif du milieu, épuisement qui amènerait une sporulation définitive comparable à celle obtenue sur gélose, mais ici très rapidement, peut-être justement par l'impossibilité de repiquage spontané que présente une gélose (n° 1 - 6 et 7).

c) Les formes dites avec le bouillon
de 3 jours à 42,5 degrés,

montrent, comme la première série de gammes, une résistance des spores allant jusqu'à 10 U par cc de streptomycine à 42,5 degrés, qu'à 37 degrés. Ceci paraît étonnant à première vue, car nous savons classiquement que les germes à 42,5 degrés ne donnent pas de spores (n° 1). En fait, en accord avec les travaux de M. FLEURY, nous verrons, dans l'étude microscopique des tubes, que le bacille charbonneux arrive à sporuler d'une façon détournée par l'intermédiaire des formes végétatives dites anormales (n° 7). Nous admettons momentanément cette sporulation et en concluons que les spores de ces formes anormales sont résistantes à 10 U par cc de streptomycine, taux identique à celui des spores des bacilles normaux.

II.- L'ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR LA SPORULATION.

Ce sont les examens microscopiques qui permettent d'apprécier l'influence de la streptomycine sur la sporulation des bactéridies charbonneuses. Ces examens microscopiques sont pratiqués quotidiennement.

Nos résultats sont classés en deux groupes :

- les gammes de tubes placées à l'étuve à 37 degrés.

- les gammes de tubes placées à l'étuve à 42,5 degrés.

A/ - les gammes de tubes placées à l'étuve à 37 degrés :

a) Dans les tubes dépourvus de streptomycine, les premiers germes sporulés apparaissent au bout de 48 heures d'étuve. Si nous continuons à observer le devenir des germes, nous constatons, comme nous l'avons déjà relaté, qu'après 12 jours d'étuve à 37 degrés, le bouillon non streptomyciné montre encore, à côté des chaînes sporulées, des bactéridies dépourvues de spores, en phase de multiplication : les spores apparaissant germeraient et donneraient les germes en multiplication et cela jusqu'à l'épuisement nutritif du bouillon.

b) Dans les tubes à dose infrabactériostatique, on assiste à une diminution du temps de sporulation : les premiers bacilles sporulés apparaissent au bout de 24 heures ; à côté de ces bacilles sporulés, nous voyons des bacilles sans spore, et, d'autre part, des chaînes bacillaires qui semblent être en voie de lyse et correspondent vraisemblablement aux germes

sensibles, car, dans une population microbienne, on trouve toujours parmi les différentes souches bactériennes des variations du caractère de sensibilité à l'antibiotique (n° 10).

c) Pour les doses bactériostatiques, que ce soit le tube proche de la limite de résistance du germe, ou le tube ayant 2,000 U par cc d'antibiotique, l'aspect est le même:

- aucun bacille normal sous sa forme végétative n'est visible, exception faite évidemment, des bacilles aperçus dans les tubes qui donnent lieu aux "cultures retardées", ou dans les tubes où poussent les germes "mutants" résistants; ces deux aspects seront envisagés ultérieurement.

- seules sont observées des chaînes bacillaires en désagrégation, de coloration très inégale et dans lesquelles parfois on aperçoit de petites spores incolores qui correspondent, semble-t-il, aux spores résistant à l'action bactéricide de la streptomycine.

- l'observation ultérieure de ces tubes aboutit à la disparition complète de ces chaînes en voie de lyse.

B/- Les gammes de tubes placées à l'étuve à 42,5 degrés :

a) Dans les tubes témoins sans streptomycine, nous observons une évolution du bacille comparable à celle décrite par M. PITZURRA sur le milieu asporogène d'Agar Tryptose Difco (n° 7). Mais à 42,5 degrés, il semble que nous ayons affaire à un cycle asporogène accéléré: en effet, après

24 heures d'étuve à 42,5 degrés l'examen microscopique montre des aspects de "formes végétatives anormales" absolument identiques à celles décrites et photographiées par M. PITZURRA (chaînes enroulées, spiralées, formant parfois de véritables amas de bacilles très déformés et atypiques).

L'auteur obtenait sur le milieu d'Agar Difco une multiplication des formes anormales pendant 50 jours consécutifs sans qu'il y ait de passage par la spore : les spores apparaissaient après ce délai au sein des formes anormales, puis germaient pour donner des bacilles de forme normale qui, après la phase classique de multiplication, évoluaient de nouveau vers les formes anormales, dans le cas évidemment où les conditions de vie asporogène demeuraient.

Dans notre observation, après seulement 24 heures d'étuve à 42,5 degrés, nous voyons très nettement, au sein des formes végétatives anormales, des spores brillantes, incolores et même déjà des chaînes de bacilles de morphologie normale, intensément colorés, résultant vraisemblablement de la germination de ces spores : nous relevons très fréquemment la présence d'amas de bacilles anormaux d'où semblent émerger des bactériidies de type normal, très colorées, alors que les amas anormaux ont une coloration inégale, rappelant la phase de diaphanisation. Nous en concluons que ce que nous observons à 42,5 degrés est un cycle comparable à celui obtenu sur Agar Tryptose Difco, mais dont le rythme serait accéléré : ce cycle accéléré peut être schématisé par la courbe n° 9.

Le cycle asporogène observé dans le bouillon à 42,5 degrés, nous apparaît,

comme nous l'avons déjà dit, accéléré : ce bouillon à 42,5 degrés réalise certainement un milieu de vie asporogène, identique à celui du milieu Difco, mais en plus il doit représenter pour le bacille charbonnant un milieu nutritif très déficient : nous voyons, en effet, d'après les courbes, que, pour obtenir un bout de 24 heures d'étuve à 42,5 degrés, à la fois des formes anormales sporulées et des germes normaux d'origine sporale, il faut admettre que les phases de multiplication des germes normaux et des formes anormales sont très diminuées : le milieu à 42,5 degrés réaliserait un milieu asporogène uniquement pour les bacilles normaux.

Par contre, le milieu Difco réalise le vrai milieu asporogène, tout au moins pendant 50 jours : effectivement, M. TIGHEM décrit, après l'ensemencement sur milieu Difco :

- une phase de multiplication des germes normaux : puis ces germes entrent dans leur phase de repos et apparaissent alors les premières formes végétatives anormales,

- d'autre part, une multiplication de ces formes anormales, sans apparition de spores, pendant 50 jours, après quoi apparaissent les premières spores au sein des bacilles anormaux, spores qui germeront pour donner les bacilles normaux.

A 42,5 degrés, comme d'ailleurs sur le milieu Difco, nous n'observons jamais la sporulation des formes végétatives normales apparues secondairement : ces bacilles normaux qui apparaissent, se trouvent dans la même position que les germes ensemencés initialement et vont évoluer de façon iden-

tique : ils se multiplient et lorsqu'arrivera leur phase de repos, ils se dissocieront

- en formes végétatives anormales,
- et en chaînes de bacilles qui se diaphanisent, se lysent et disparaissent sans sporuler.

b) Dans les tubes contenant les doses infobactériostatiques de streptomycine, nous retrouvons, au bout de 24 heures, exactement le même aspect que dans le tube sans antibiotique :

- formes anormales avec spores,
- formes normales, ne présentant pas de spore et ayant pour origine, très certainement, les spores des formes anormales..

Donc, à 42,5 degrés, la streptomycine n'a pas d'action sensible sur la sporulation.

L'observation ultérieure des tubes, ne montre pas le phénomène d'épuisement nutritif du milieu comme nous l'avions remarqué à 37 degrés : peut-être est-ce par le fait qu'à 42,5 degrés, comme le montre l'examen microscopique, la plus grande partie des germes évoluent vers la lyse et que seule l'infime quantité de bactéries continuant à se multiplier, utilise les éléments nutritifs du milieu, qui mettra par conséquent plus longtemps à présenter des signes d'épuisement (n° 6 - 27 - et 34).

c) Pour les doses bactériostatiques, ne sont visibles au bout de 24 heures que des chaînes de bacilles anormaux en désagrégation, en voie de lyse et dans

lesquelles nous apercevons parfois quelques rares spores.

III.- DESCRIPTION DE QUELQUES FAITS OBSERVÉS AU COURS DES EXPERIMENTES PRECEDENTES:

Il faut signaler que ces faits se sont tous manifestés dans les mêmes conditions de culture, à savoir, dans les gammes de dilutions de streptomycine qui,ensemencées avec une culture en bouillon non streptomyciné ayant séjourné à la température de 42,5 degrés pendant 3 jours, sont placées à l'étuve à 37 degrés ; il s'agit peut-être là d'une simple coïncidence.

Quels faits avons-nous remarqués ?

A/- L'apparition d'un germe d'ovule résistant à la forte concentration de streptomycine :

Nous constatons après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37 degrés que la série de tubes,ensemencés avec la culture de bacille charbonneux de trois jours à 42,5 degrés et replacés à 37 degrés, montre une culture normale dans les 2 tubes contenant 0,07 et 0,15 U par cc ; d'autre part, le tube contenant 2,5 U par cc de streptomycine montre lui aussi une culture, peut-être légèrement moins dense que celle des deux premiers tubes.

Pensant immédiatement à une souillure, nous pratiquons avec ce tube un isolement sur trois géloses ordinaires et un étalement sur une lame qui est colorée avec le bleu de méthylène après fixation à l'alcool ; ces examens montrent qu'il s'agit

de la bactériodie de DAVAINÉ :

- sur les géloses, ce bacille donne des colonies absolument identiques à celles du germe d'origine qui n'a jamais subi l'action de la streptomycine, sans restriction de taille, à l'inverse des colonies des germes ayant acquis la résistance à la streptomycine, que nous avons étudiés dans le chapitre précédent et qui, eux, donnaient des colonies de diamètre réduit.

- ce germe présente le même temps de sporulation que le bacille d'origine : de grosses et nombreuses spores sont visibles après 24 heures sur gélose à 37 degrés.

- repiqué dans une gamme de dilutions progressives de streptomycine, ce germe montre une résistance totale à toutes les concentrations de streptomycine, même à 2.000 U par cc : nous assistons donc à un "gain de résistance" considérable ; ce caractère des germes mutants les distingue des germes dont il a été question dans le premier chapitre ; ces derniers germes isolés dans le tube à 80 U par cc, se montraient sensibles au taux de streptomycine immédiatement supérieur à 80 U et ne présentaient aucun gain de résistance.

- une seconde gamme de dilutions de streptomycine, faite avec le germe mutant à l'état de spore, montre la même résistance à l'antibiotique que le germe sous sa forme végétative : donc les spores du germe peuvent germer dans des milieux contenant des concentrations très élevées d'antibiotique. Ceci oppose ce germe :

- d'une part, aux germes d'origine, n'ayant jamais subi l'action de la streptomycine, qui présentent un taux li-

mite de germination de leurs spores égal à 0,15 - 0,30 U par cc, valeur très inférieure à celle du tube de résistance de leur forme végétative qui est de 1,25 U par cc.

- d'autre part, aux germes, étudiés dans le chapitre précédent, qui avaient acquis une résistance à 80 U par cc ; nous avons constaté que les gammes de dilutions de streptomycine ensemencées avec les spores de ces bacilles n'avaient poussé que jusque dans le tube contenant 5 U par cc d'antibiotique ; nous pouvons maintenant éclaircir ce phénomène : 5 U paraît être le taux limite au delà duquel les spores ne peuvent plus germer ; il semble donc que les spores des bactériidies charbonneuses qui ont acquis la résistance à la streptomycine, augmentent aussi leur pouvoir germinatif (n° 22 - 23 - 24 - 25).

- Notons enfin, qu'il ne s'agit pas d'une souche "streptomycino-résistante", en effet, le tube témoin ne contenant pas de streptomycine, pousse aussi abondamment que les autres.

L'isolement d'un tel germe résistant, met en évidence un deuxième type d'acquisition de la résistance à la streptomycine : l'antibiotique joue alors un rôle de sélection de la souche mutée au sein de la population microbienne et cela permet de comprendre l'aspect dit "à un seul échelon" de l'acquisition de la résistance, modalité, qui selon les auteurs classiques, est habituelle avec la streptomycine (n° 10 - 23 - 24 - 25 - 26 - 33).

1/- Les "cultures tardives" : certains tubes :

Il s'agit toujours des gammes de dilutions de streptomycine placées à l'étuve à 37 degrés et inoculées avec le bouillon non streptomyciné ayant séjourné à l'étuve à 42,5 degrés pendant 3 jours.

Ces poussées tardives ont eu lieu :

- une première fois, dans le tube contenant 100 U par cc. de streptomycine,

- et deux autres fois, dans les tubes à 10 U par cc.

Notons tout de suite que, chaque fois, ces cultures ont été trouvées dans des tubes contenant des doses d'antibiotique habituellement bactériostatiques.

Croyant, dans les 3 cas, avoir affaire à des souillures, chacun de ces tubes est isolé sur trois géloses inclinées : après 24 heures d'étuve, apparaissent sur ces géloses deux sortes de colonies :

- les unes, absolument identiques à celles des bactériidies charbonneuses d'origine, indemnes de streptomycine, qui ont pour origine les spores des bacilles qui ont résisté à l'action bactéricide de la streptomycine.

- les autres, en nombre variable, présentent des caractères très spéciaux :

= ce sont de très petites colonies, ayant 0,5 à 1 mm de diamètre, blanc bleuté, translucides, à surface finement granuleuse, à pourtour assez bien circonscrit.

= au microscope, ces petites colonies sont constituées de bacilles charbonneux, de morphologie absolument semblable à celle des bacilles d'origine indemnes de streptomycine.

= leurs propriétés virulentes sont les mêmes que celles du bacille qui n'a jamais subi l'action de la streptomycine.

= les germes qui composent ces petites colonies ont, par contre, un caractère physiologique très particulier : ils présentent un retard important dans leur sporulation ; en ce qui concerne les colonies obtenues à partir des tubes à 10⁻⁷ par cc, les spores n'apparaissent qu'après 48 heures sur gélose à 37 degrés, alors que le germe d'origine, nous l'avons déjà dit, sporule abondamment sur le même milieu et à la même température.

= l'évolution de ces petites colonies sur une gélose à 37 degrés, se fait vers un accroissement de leur taille, elles prennent en 2 à 3 jours d'étuve l'aspect des colonies des bacilles d'origine, sans toutefois atteindre leur taille : elles restent toujours des colonies assez petites.

= l'aspect de "petites colonies translucides", se conserve lors des repiquages sur gélose, pratiqués toutes les 24 heures pendant une quinzaine de jours : de même, le repiquage des petites colonies grossies à l'étuve, redonne les mêmes petites colonies. Toutefois, dans les deux cas, nous n'avons jamais pu obtenir de culture faite uniquement de petites colonies translucides : à chaque repiquage, nous assistons à une sorte de dissociation et reproduction, à partir d'une petite colonie

translucide, d'une multitude de petites colonies translucides, identiques à celle dont on est parti, mais parsemées de colonies un peu plus grosses, jaunâtres, ayant perdu leur translucidité et montrant au microscope une sporulation légèrement plus précoce : le repiquage d'une colonie de ce dernier type aboutit lui aussi à une dissociation en colonies translucides et colonies plus grosses, opaques.

= En ce qui concerne leur résistance à la streptomycine, nous avons réensemencé deux gammes de dilutions de l'antibiotique :

.- l'une avec le germe en phase de multiplication (culture en bouillon de 24 heures à 37 degrés),

.- l'autre avec les spores du germe, obtenues sur une culture en gélose, abandonnée pendant 2 mois à la température du laboratoire.

Nous constatons, quant aux formes végétatives, qu'elles présentent un gain de résistance, mais il est limité, ce qui les différencie des germes mutants résistants : en effet, isolé dans le tube à 10 U et réensemencé sur une nouvelle gamme de dilutions d'antibiotique, ce bacille charbonneux pousse jusqu'au tube à 100 U par cc compris. Quant aux spores, elles se montrent encore capables de germer dans le tube ayant 10 U de streptomycine : on assiste, par conséquent, à une augmentation du pouvoir germinatif des spores, les spores du bacille d'origine, indemne de streptomycine, ne pouvant germer au-dessus de 0,30 U par cc.

Comme nous l'avons vu, ces germes apparaissent dans des tubes qui normalement ne montrent aucune culture ; tout se passe comme s'il s'agissait d'une "culture secondaire" qui se manifeste après le 6ème jour d'étuve dans le cas du tube à 100 U, après le 4ème jour dans les tubes contenant 10 U par cc d'antibiotique.

En fait, l'étude microscopique minutieuse des contenus des tubes vient infirmer la notion de "culture secondaire" ; dès le premier jour, nous apercevons à l'examen microscopique, dans les tubes où apparaîtront ces "cultures secondaires", quelques bacilles en courtes chaînettes et souvent isolés, bien colorés et dépourvus de spore ; il s'agirait donc plutôt, non pas de cultures secondaires, mais de "cultures ralenties" de souches bactériennes résistantes, dont la multiplication serait ralentie par la présence de l'antibiotique d'où le trouble du bouillon visible à l'oeil nu seulement à partir du 4ème jour ; d'ailleurs, si l'on considère la taille des colonies que donnent les germes et le retard qu'ils présentent dans leur sporulation, leur particularité physiologique semble bien être une "vie au ralenti" : multiplication plus lente et par suite, retard de la sporulation qui, nous le savons, correspond à la phase de repos du germe, survenant après la phase de multiplication. Le ralentissement de la multiplication observé, serait en accord avec les travaux de R. LINZ et E. LECOCQ (n° 10 - 11), qui rapportent que souvent, bien que résistants, les bacilles sont gênés dans leur vie végétative par la présence de l'antibiotique. On peut aussi imaginer que le mécanisme de résistance de ces bacilles à des doses normalement bactériostatiques de streptomycine,

réside justement dans leur ralentissement physiologique : se multipliant plus lentement, ces germes ont un métabolisme inférieur à celui des bacilles d'origine, ils ont donc des besoins nutritifs diminués et l'on peut penser que le bouillon streptomyciné à 10 U par cc, constitue encore un milieu nutritif suffisamment riche pour permettre leur culture ralentie. Ces germes qui donnent lieu à des cultures apparentes retardées peuvent, peut-être, être rapprochés des germes que l'on appelle "les survivants" aux antibiotiques : il s'agit de bacilles possédant une résistance légèrement supérieure à celle de la plupart des germes qui constituent la population microbienne, ils donnent des cultures apparentes retardées, car, dans la population microbienne, ils ne sont représentés que par quelques rares individus bactériens et que, d'autre part, leur prolifération est gênée par la présence de l'antibiotique.

CONCLUSIONS

- 3 -

1.- En ce qui concerne l'acquisition de la résistance de "*Bacteridium Anthracis*" à la streptomycine,

nous avons rencontré les deux modes décrits classiquement :

- "la résistance à plusieurs échelons successifs", obtenue, d'ordinaire, avec la pénicilline,

- et "la résistance à un seul échelon", qui donne naissance à un germe d'emblée résistant à des doses élevées d'antibiotique, type habituel avec la streptomycine.

2.- Pour ce qui est de l'action de la streptomycine sur le bacille charbonneux :

- les bactériidies charbonneuses se montrent beaucoup plus sensibles à la température de culture de 42,5 degrés, qu'à la température de 37 degrés ; à 42,5 degrés, nous avons trouvé que le bacille présentait des formes végétatives anormales, identiques à celles observées par M. PITZURRA sur le milieu d'Agar Tryptose Difco, inhibant la sporogénèse ;

- les formes végétatives normales ont un taux de résistance égal à 1,25 U par cc de streptomycine ; les formes végétatives anormales ne résistent qu'au taux de 0,07 - 0,15 U par cc.

- les spores des bactériidies charbonneuses ne peuvent pas germer dans les tubes contenant des concentrations de streptomycine supérieures à 0,15 - 0,30 U par cc.

- ce taux de germination des spores peut augmenter ; c'est le cas des germes qui ont acquis la résistance à l'antibiotique ou des bacilles se montrant d'emblée résistants à des doses très élevées de streptomycine.

- les spores semblent montrer une résistance élevée à l'effet bactéricide de la streptomycine : certaines sont encore trouvées intactes dans les tubes contenant 10 U par cc.

- la possibilité qu'ont les bacilles charbonneux de sporuler, donne à l'étude de l'action bactéricide de l'antibiotique, un double aspect :

= action sur les formes végétatives qui, ou bien sont lysées, ou bien parfois résistent et végètent à un rythme ralenti et pourraient être rapprochées de ce que l'on appelle classiquement "les germes survivants".

= action sur les spores qui se montrent beaucoup plus résistantes que les formes végétatives.

3.- Nous revenons au sujet de l'action de la streptomycine sur la sporulation:

- à 37 degrés, la sporulation des germes

est plus précoce en présence de doses infra-bactériostatiques de streptomycine.

- Par contre, à 42,5 degrés, l'antibiotique ne semble pas agir sur la sporulation très particulière que présentent les formes végétatives anormales caractéristiques du mode de vie asporogène.

4.- Enfin, notons que les cultures du germe à 42,5 degrés pendant 3 jours, ensemencées ultérieurement dans les gammes de dilutions de streptomycine séjournant à 37 degrés, nous ont permis d'obtenir :

- d'une part, le germe d'emblée résistant à des doses très élevées de streptomycine,

- d'autre part, des germes à vie ralentie, à sporulation retardée, qui donnent lieu à des cultures apparaissant tardivement à l'oeil nu dans les tubes contenant des doses d'antibiotique ordinairement bactériostatiques.

Ces deux sortes de germes proviennent des seules cultures à 42,5 degrés ; est-ce le simple effet du hasard ? Ou bien, les conditions culturales des milieux à 42,5 degrés, dans lesquels seuls quelques individus bactériens vont continuer à vivre tandis que la grande partie de la population microbienne succombe, favorisent-elles des recombinaisons génétiques, à la faveur desquelles apparaîtraient de nouveaux types bactériens ?

Les expériences in vitro, rapportées dans cette étude n'apportent pas de faits particulièrement nouveaux ; elles n'en soulignent pas moins, à propos de la bactériémie charbonneuse, l'hétérogénéité des individus qui

composent la population de ce qu'on dénomme "une souche bactérienne" ; les conditions de la culture, la composition des milieux (cette dernière englobant la présence ou l'absence d'antibiotiques, et dépendant aussi du nombre de germes en lyse) constituent autant de facteurs de sélection qui règlent le devenir de la descendance de certains de ces individus aux dépens de celle des autres. Cette notion, démontrable in vitro, doit toujours rester présente à l'esprit du médecin qui essaye d'interpréter les observations recueillies en pathologie infectieuse.

- 1 -

Vu :
Le Président :
signé : R. FASQUELLE

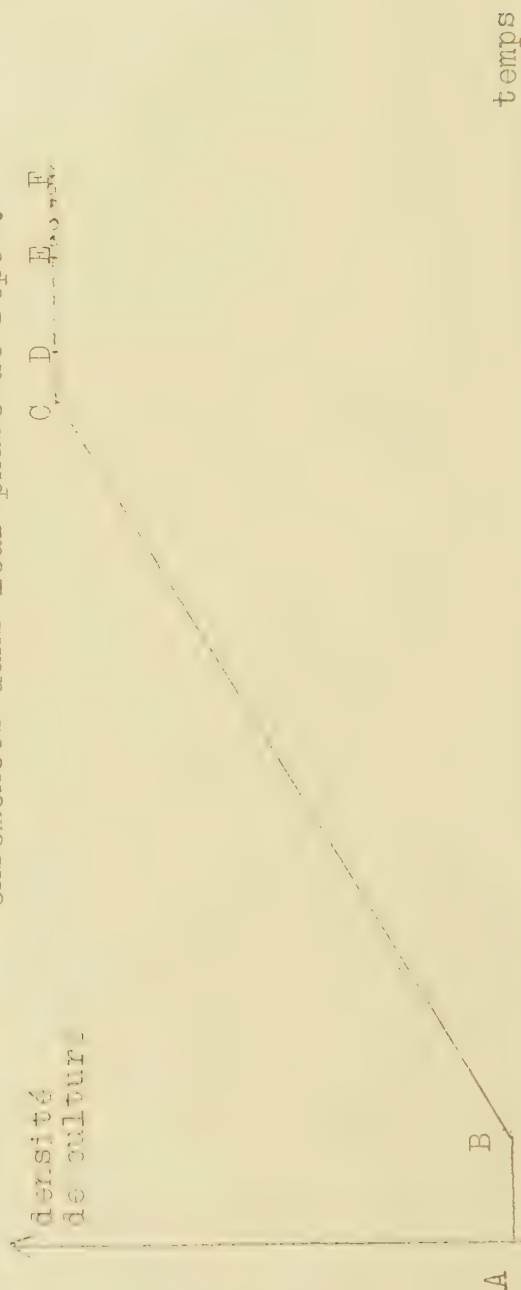
Vu :
Le Doyen :
signé : L. PINET

Vu et Permis d'Imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
signé : Jean SARRAILH.

- COURSES -

- 8 -

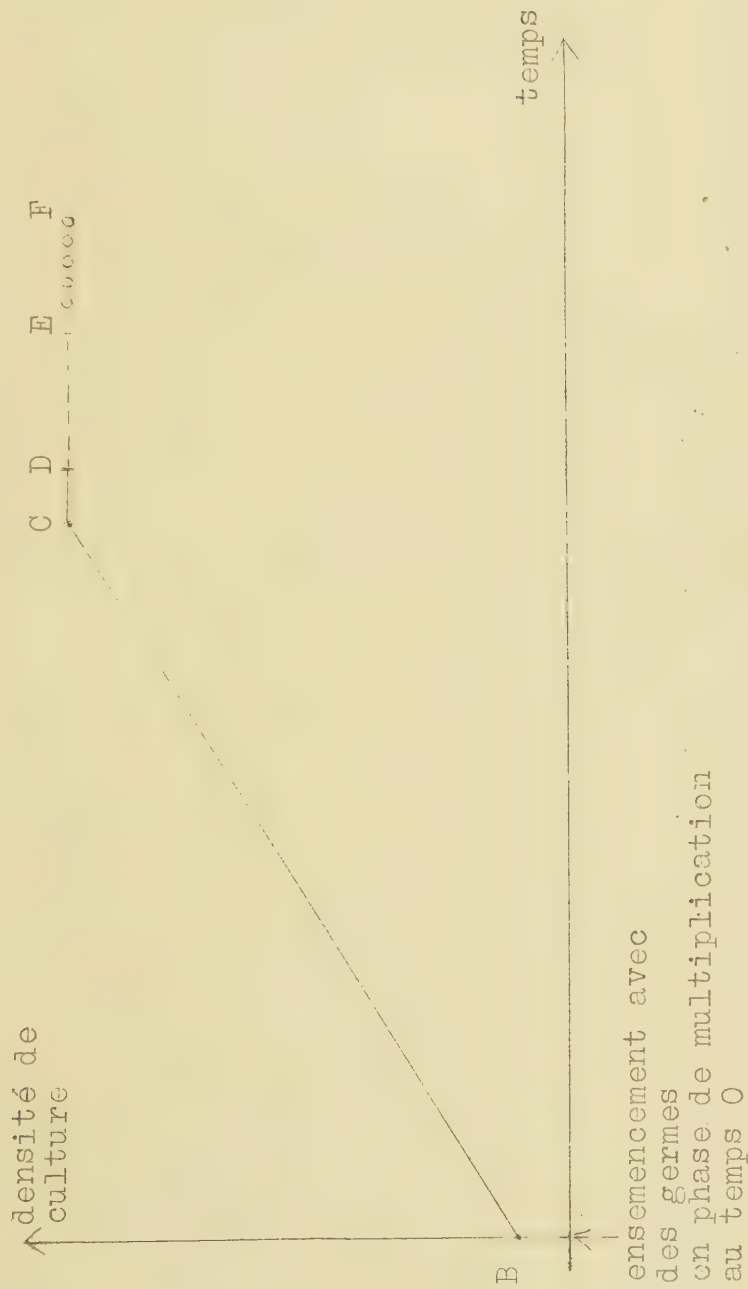
COURBE no 1 : Aspect de la courbe de croissance des germes
ensemencés dans leur phase de repos.



ensemencement
avec des germes en
phase de repos au
temps C

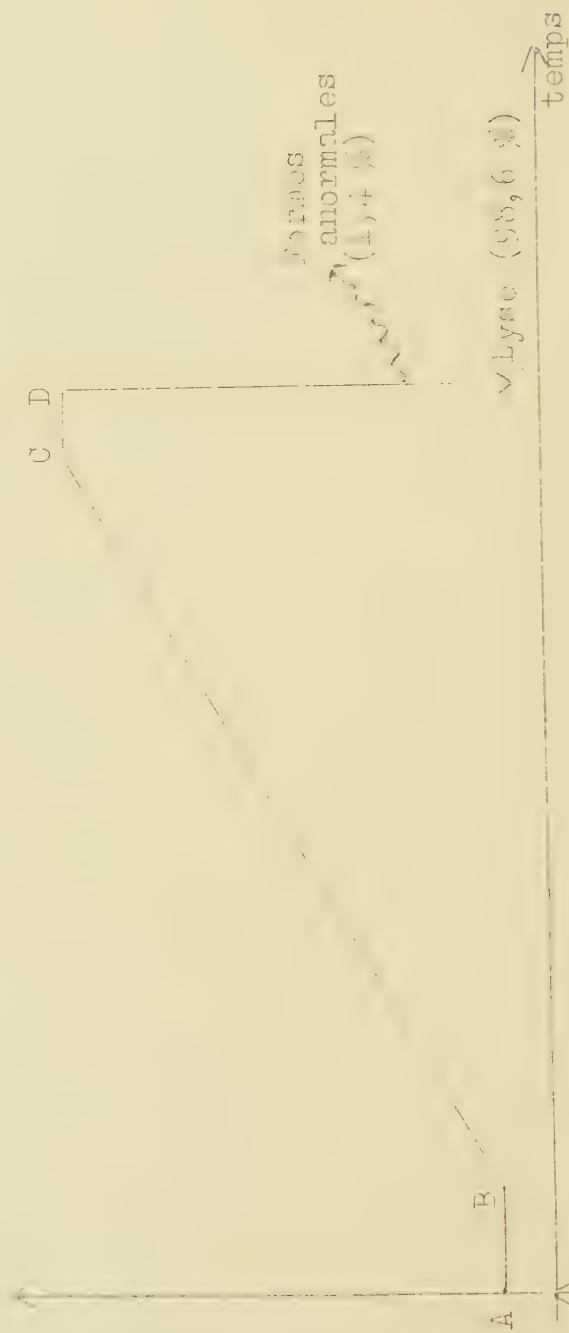
AB = temps de latence
BC = phase de multiplication
CD = phase de repos comprenant :
DE = arrêt de multiplication du germe
EF = diaphanisation des germes
EF = sporulation.

COURBE N° 2 - Aspect de la courbe de croissance des germes
ensemencés en phase de multiplication :
absence de temps de latence.



COUREAU No 3 - Aspect de la courbe de croissance des germes
ensemencés sur un milieu inhibant la sporogénèse

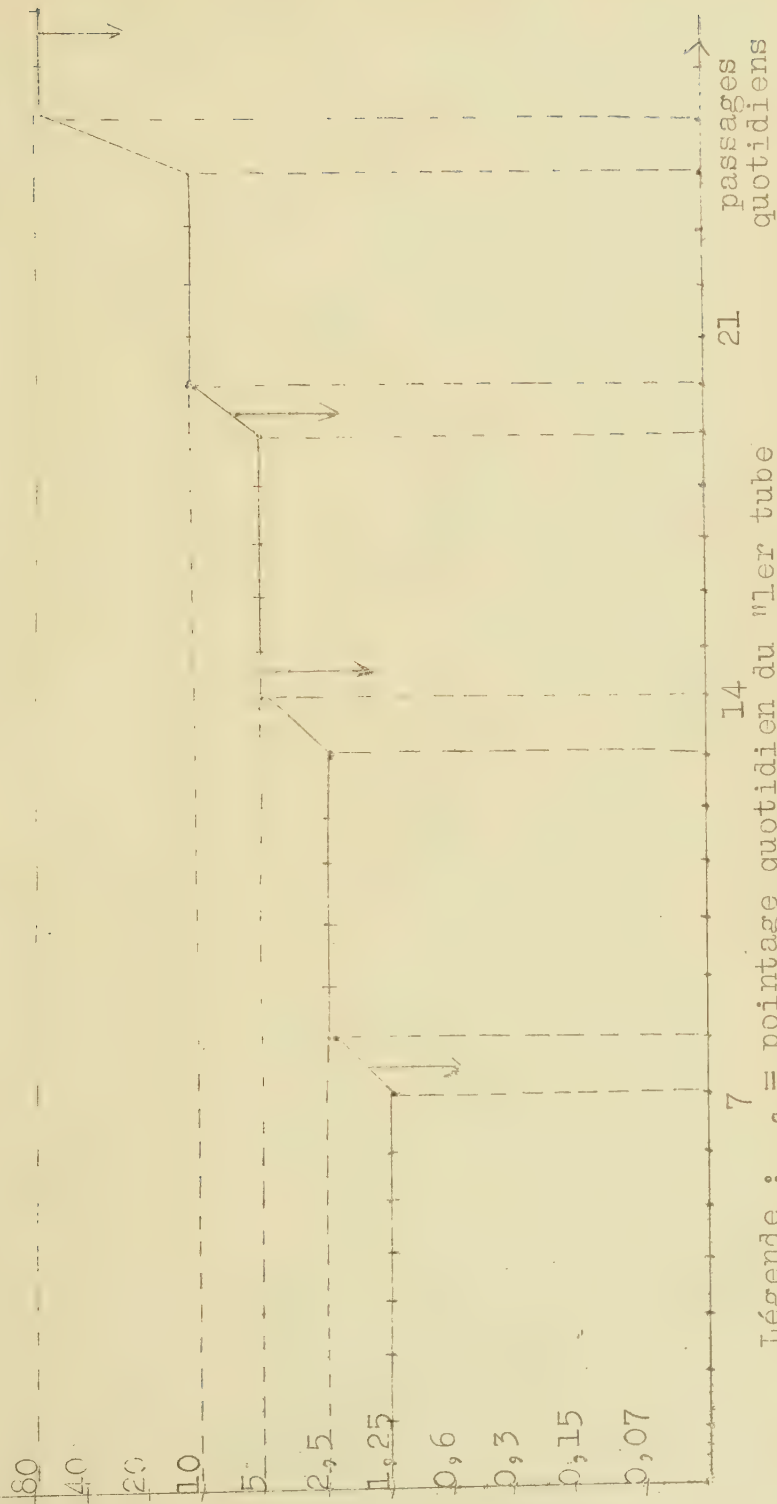
densité de
culture



ensemencement
des germes en phase de
repos, au temps 0

concentrations de streptomycine en U/cc

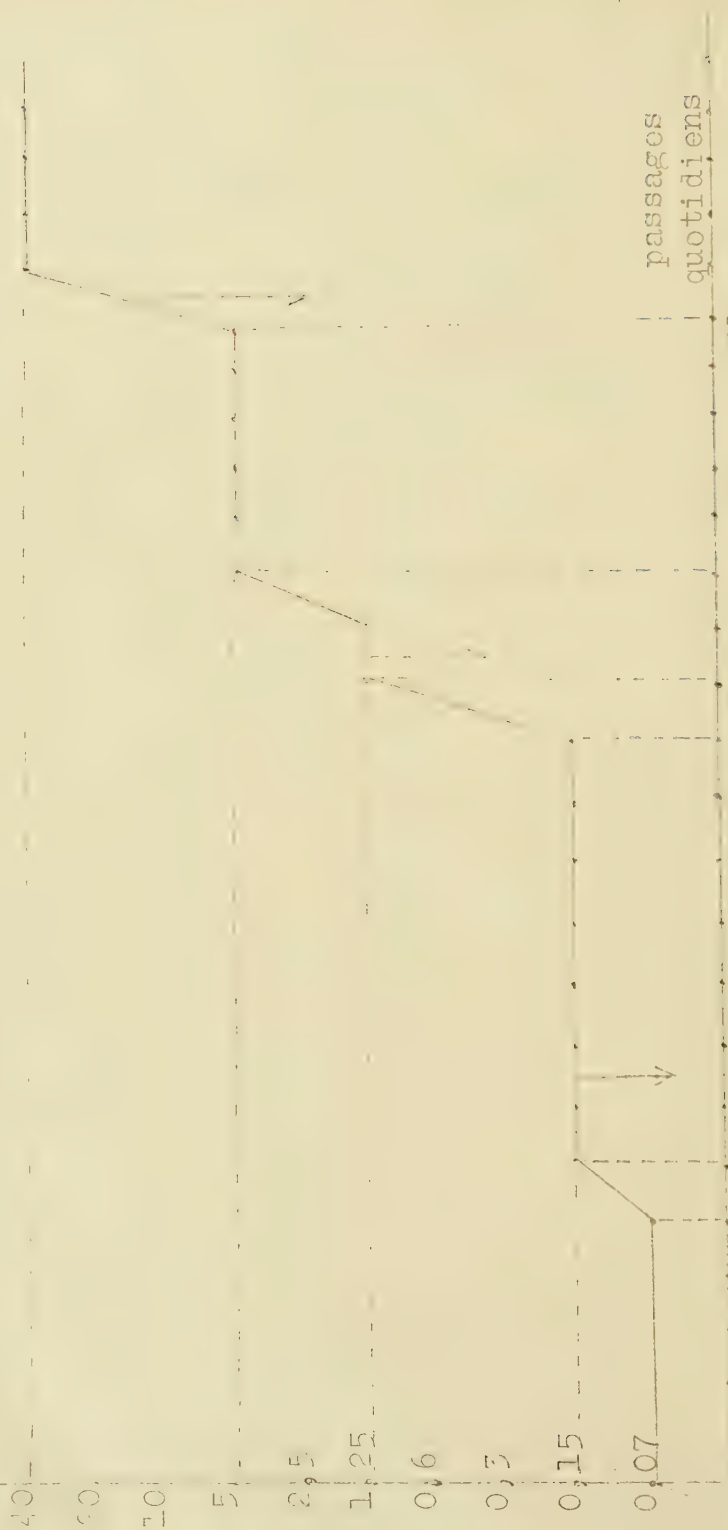
COURBE n° 4 - Acquisition de la résistance à la streptomycine, à 37 degrés.



Légende : . = pointage quotidien du "1er tube qui pousse"
 ↓ = aspect de "récupération" de la sensibilité

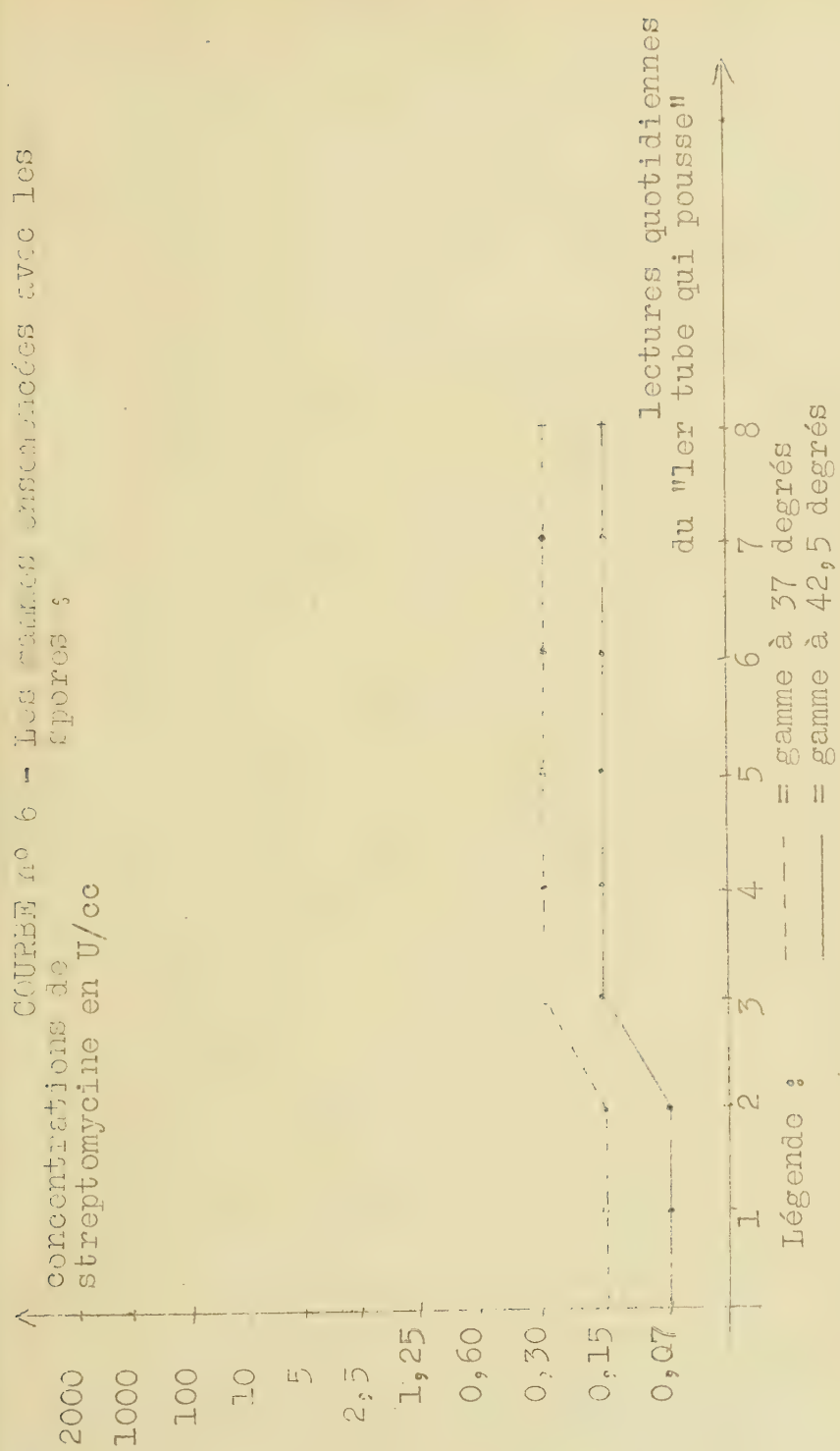
COURBE N° 5 - Acquisition de la résistance à la streptomycine, à 42.5 degrés.

concentrations de streptomycine, en U/cc



Légende : • = pointage quotidien au "fer tube qui pourrit"
 ↓ = aspect de "récupération" de la sensibilité

COURBE n° 6 - Les gammes consécutives avec les concentrations de streptomycine en U/cc



concentrations de streptomycine en U/cc

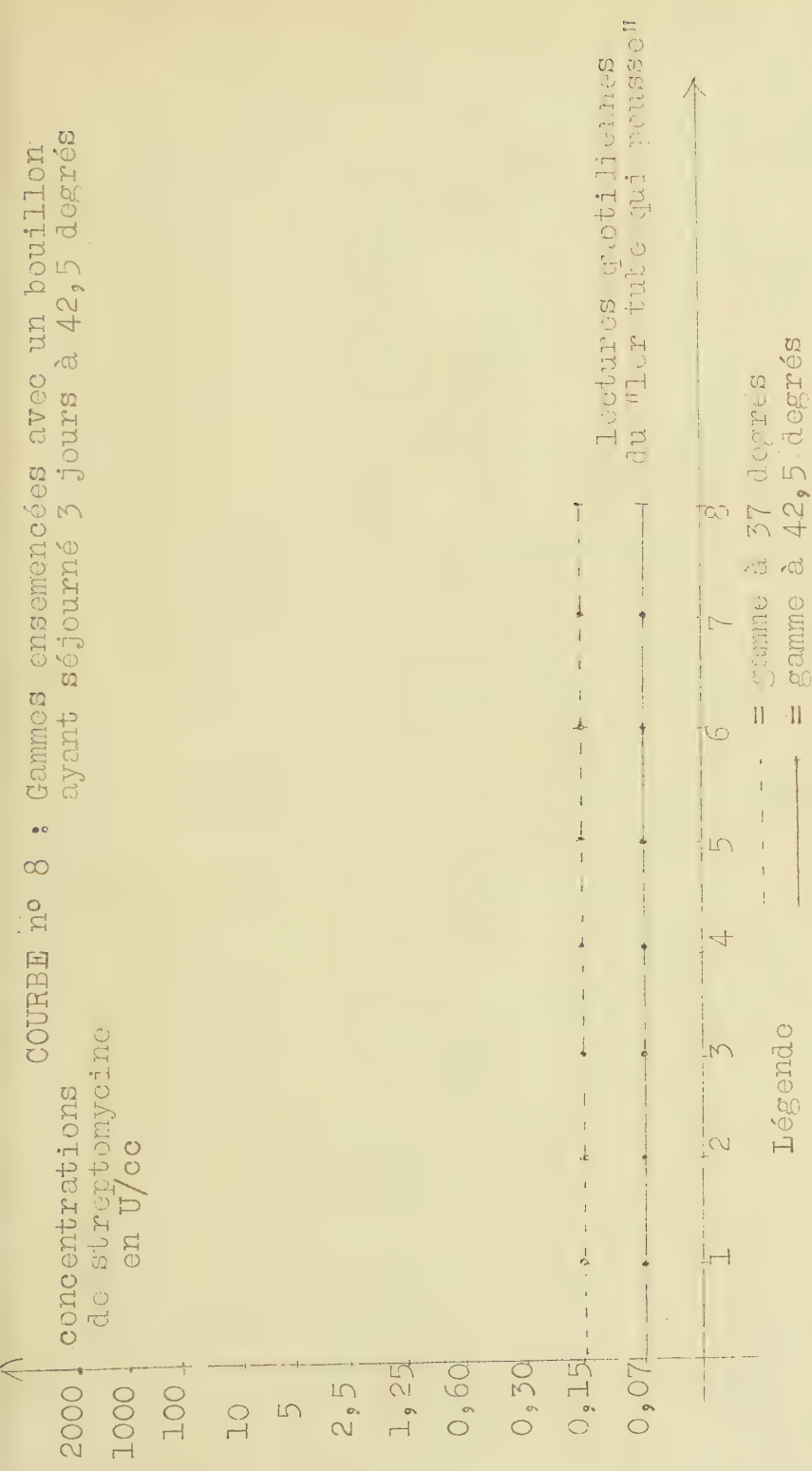


COURBE n° 7 -- Gammes ensemencées avec le bouillon ayant séjourné 3 jours à 37 degrés:

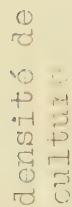
lectures quotidiennes du "1er tube qui pousse"

Légende
 ----- = gamme à 37 degrés
 ----- = gamme à 42.5 degrés

COURBE n° 8 : Gammes ensemencées avec un bouillon
 ayant séjourné 3 jours à 42,5 degrés



COURRE no 9 - Comparaison du cycle asporogène sur milieu Difco et en bouillon à 42,5 degrés



BIBLIOGRAPHIE

- :-

- 1 - "Les oeuvres de PASTEUR"
réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT
- 2 - A. STAUB et B. VIRAT
Nouvelle formule de vaccin contre
le charbon bactérien
C.R. Acad. Sci. 1954 t. 238 p. 748
- 3 - A. STAUB, B. VIRAT et J. LEVADITI
Pouvoir léthal de certaines souches
acapsulogènes de B. Anthracis
Ann. Inst. PASTEUR 1955 t. 88
p. 244-46
4. - E. RENAUX
Culture de Bacillus Anthracis en
milieu calcaïque et en milieu oxalaté
Ann. Inst. PASTEUR 1952 t. 82 p.38-45
- 5 - J. DEOM et J. MORTELMANS
Influence de la concentration en
peptone sur la culture et la sporula-
tion de B. Anthracis
Ann. Inst. PASTEUR 1953 t. 85 p.671-74
- 6 - N. GRELET
Nutrition azotée et sporulation de
Bacillus Cereus
Ann. Inst. PASTEUR 1955 t.88 p.60-75

- 7 - M. PITZURRA
Il ciclo vitale del B. Anthracis in
terreno inibente la sporogenesi
Riv. Ist. Sier. Milan 1954 t. 33
p. 601-611
- 8 - C. LEVADITI et J. HENRY
Mode d'action de la streptomycine
sur B. anthracis in vitro
C.R. Soc. Biol. 1947 p. 513
- 9 - C. MELANIDIS et G. ZARIFOPOULOS
Etude expérimentale sur l'action
bactériolytique de la streptomycine
sur le B. Anthracis
Arch. Inst. PASTEUR Hellen. 1956 t.2
p. 71
- 10 - M. MORIN, J. NEHLIL, R. PICHON
La streptomycine
Masson et Cie 1949
- 11 - R. LINZ et E. LECOCQ
Influence de la streptomycine sur la
multiplication des bactéries dites
résistantes à son action bactério-
statique
C.R. Soc. Biol. 1954 t. 148 p. 930
- 12 - Y. CHABBERT
Questions pratiques sur la détermi-
nation de la sensibilité des germes
aux antibiotiques
La Vie Médicale, juin 1956 p. 765
- 13 - R. MINCK et Mme MINCK
Modifications cytologiques des bac-
téries sous l'effet de la pénicilline
C.R. Acad. Sci. t.228 janv.49 p. 279

- 14 - R. TULASNE
Etude de nos connaissances sur les
cycles type L et sur les formes L
des bactéries
Biol. Mod. 1955 t. 44 p. 391-425
- 15 - O. KANDLER et G. KANDLER
Trennung und Charakterisierung
verschiedener L-phasen-typen von
Proteus Vulgaris
Z. Naturforsch. 1956 t. 11b p.252-59
- 16 - A. KAFFKA
Zur Morphologie des Milzbrandbacillus
unter der Einwirkung von Antibiotids
Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. 1955 t. 163
p. 333
- 17 - K. LIEBERMEISTER, E. KELLENBERGER
Studien zur L-Form der Bakterien
Z. Naturforsch 1956 t.11b p.200-206
- 18 - A. BESSEMANS et R. DEROM
Influence de la pénicilline in vitro
et in vivo sur le Bacillus Anthracis
Ann. Soc. Belge Med. Trop. Déc. 1944
p. 185
- 19 - C.F. ROBINOW
Spore Structure as revealed by thin
section
J. Bact. 26 octo. 1953
- 20 - C.F. ROBINOW
The structure of Bacillus spores
Bact. Proc. 1950
- 21 - F.L. DAVIS , O.B. WILLIAMS
Comparaison of spore resistance to
heat and to certain chemical agents
Bact Proc. 1950 p. 59

- 22 - H. MONDOLFO et E. HOUNIE
Azione degli antibiotici sulle spore
Boll. Ist. Sier. Milan 1951 t. 30
p. 176-82
- 23 - R.B. MEEFFERD Jr et G. WYSS
The mutability of Bacillus Anthracis
Spores during germination
Journal of Bact. 1951 t. 61 p. 357-64
- 24 - M.G. SEVAG et E.I. ROSANOFF
Mechanism of the developpment of
resistance to streptomycin
J. Bact. 1952 t. 63 p. 243-52
- 25 - M. BARBER
Apparition de la résistance chez
les bactéries
J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.
1955 n° 9 p. 71
- 26 - N. MOLOMUT, L.J. WARSHAW et E.M. GROSS
Development of antibiotic resistance
by bacteria ; effect of serial sub-
culture in antibiotic mixtures
J. Amer. Med. Ass. 1956 t. 160 p.977
- 27 - N. MANNINO et V. PIPITONE
Il problema della vitaminsintesi
batterica nel quadra della resistenza
agli antibiotici
Boll. Ist. Sier. Milan 1955 t. 34
p. 374-81
- 28 - J. JENSEN
Erfahrungen mit der Penicillin und
Streptomycin in der Immunisation
mittels Sporen
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 1950 p.112-155
- 29 - H. JACOTOT et B. VIRAT
La longévité des spores de B.Anthraxis
Ann.Inst. PASTEUR 1954 t. 87 p.215

- 30 - A. DIANA
Ricerche sull' azione di alcuni anti-
biotici (streptomycina e penicillina)
sul B. Anthracis
Atti. Soc. Ital. Sci. Veter. 1951
- 31 - L.P. GAROD
The sensivity of B. Anthracis to
antibiotics
Antibiot. Chemoth. 1952 t. 2 p.689-92
- 32 - I.F. BATYOUK
Propriétés des cultures du bacille
charbonneux effectuées à différentes
températures
J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.
1956 n° 1 p. 19
- 33 - M. BELJANSKI
Etude des acides nucléiques de sou-
ches bactériennes résistantes à la
streptomycine et de souches de même
espèce moins sensibles à l'antibiotique
Inst. PASTEUR 1956
- 34 - T.W. PEARCE et E.O. POWELL
A selective medium for B. Anthracis
J. gener. Microbiol. 1951 t. 5 p.387-
90

